

2,4-DINITRO-1-CHLORBENZOL-
KONTAKTALLERGIEZEIT
(DNCB-KAZ) DES
MEERSCHWEINCHENS

EIN TIEREXPERIMENTELLES MODELL
ZUR EPIKUTANEN TESTUNG DES
IMMUNSTATUS

Dieter Weimann

*Diss.
München
1985*



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554620_0041

Aus der Dermatologischen Klinik und Poliklinik der
Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h. c. Braun-Falco

2,4 - DINITRO - 1 - CHLORBENZOL -
KONTAKTALLERGIEZEIT (DNCB - KAZ)
DES MEERSCHWEINCHENS.
EIN TIEREXPERIMENTELLES MODELL ZUR
EPIKUTANEN TESTUNG DES IMMUNSTATUS

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

D i e t e r W e i m a n n

aus Mörslingen

1 9 8 5

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. G. Burg
Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. h. c. Braun-Falco
Dekan: Prof. Dr. med. W. Spann
Tag der mündlichen Prüfung: 28. Mai 1985

INHALTSVERZEICHNIS

1	<u>EINLEITUNG</u>	
1.1	Geschichtlicher Überblick	1
1.2	Epikutantestung und Immunstatus	2
1.3	Ziel der Arbeit	3
2	<u>MATERIAL UND METHODE</u>	
2.1	1-Chlor-2,4-Dinitrobenzol-Kontaktallergiezeit (DNCB-KAZ) -Methode	5
2.2	Versuchstiere	5
2.3	DNCB-Epikutantest	5
2.3.1	Testmaterialien	5
2.3.1.1	DNCB in Salbenform	6
2.3.1.2	Immunsuppressive und immunregulative Sub- stanzen	8
2.3.2	Applikationsmodus	8
2.3.3	Beurteilung der Testreaktion	10
2.4	Versuchsdurchführung	10
2.4.1	DNCB-KAZ und DNCB-Sensibilisierungskonzentration	10
2.4.2	DNCB-KAZ - Geschlechtsunterschied	11
2.4.3	DNCB-KAZ und Dacarbazin (DTIC ^R -Dome)	13
2.4.4	DNCB-KAZ und Methotrexat ^R (MTX)	13
2.4.5	DNCB-KAZ, Methotrexat ^R (MTX) und TP-5 (syn- thetisches Pentapeptid)	15
2.5	Statistische Methode	16
3	<u>ERGEBNISSE</u>	
3.1	Standardisierung der DNCB-KAZ (Kontrolle)	17
3.1.1	DNCB-KAZ und DNCB-Salbenkonzentration	17

3.1.2	DNCB-KAZ - Geschlechtsunterschiede	19
3.2	Einfluß immunsuppressiver und immunmodulieren- der Substanzen auf die DNCB-KAZ	21
3.2.1	Dacarbazin (DTIC ^R -Dome)	21
3.2.2	Methotrexat ^R (MTX)	21
3.2.3	Methotrexat ^R (MTX) und TP-5 (synthetisches Pentapeptid)	22
3.3	Zusammenfassung der Ergebnisse	24
3.4	Statistische Überprüfung der Ergebnisse	27
4	<u>DISKUSSION</u>	
4.1	Die allergische Kontaktdermatitis	31
4.1.1	Die allergische Kontaktdermatitis als Immun- reaktion vom verzögerten Typ	31
4.1.2	Phasen der kontaktallergischen Reaktion	32
4.1.3	Sensibilisierungsphase	32
4.1.3.1	DNCB als Hapten	32
4.1.3.2	Proliferationsphase im regionären Lymphknoten	33
4.1.4	Auslösungsphase	35
4.2	Beurteilung der epikutanen Sensibilisierungs- reaktion auf DNCB und ihre Abhängigkeit von verschiedenen Faktoren	36
4.2.1	Dauer der Sensibilisierungsphase	36
4.2.2	Allergen-wirksamer Anteil der applizierten DNCB-Dosis	38
4.2.3	Versuchstiere	39
4.2.4	Applikationslokalisation	39
4.2.5	Entfernung der Haare	40
4.2.6	DNCB in nicht-toxischer Konzentration	40
4.2.7	Beurteilung der epikutanen Testreaktion	41

4.3	DNCB-Kontaktallergiezeit (KAZ) und Immun- toleranz	42
4.4	Die DNCB-Kontaktallergiezeit (KAZ) zur Be- urteilung der epikutanen Sensibilisier- barkeit	43
4.4.1	Meßgenauigkeit der DNCB-KAZ	43
4.4.2	Beeinflussung der DNCB-KAZ durch Dacarbazin (DTIC ^R)	45
4.4.3	Einfluß von Methotrexat ^R (MTX) auf die DNCB-Kontaktallergiezeit (KAZ)	46
4.4.3.1	Methotrexat ^R -Dosierung	46
4.4.3.2	Zeitpunkt der Methotrexat ^R -Applikation	47
4.4.3.3	Methotrexat ^R und T-Lymphozyten	50
4.4.4	Einfluß des synthetischen Pentapeptids TP-5 auf die DNCB-Kontaktallergiezeit (KAZ)	51
5.	<u>SCHLUSSFOLGERUNG</u>	55
6.	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	56
7.	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	58

1. EINLEITUNG

1.1 Geschichtlicher Überblick

Die Geschichte der Epikutantestung reicht bis in das Jahr 1895 zurück, als JADASSOHN (37) die "Läppchenprobe" einführte.

Der Terminus "Allergie" (griechisch: allos-anders, ergon-Tätigkeit) wurde erstmals 1906 von PIRQUET (77) erwähnt. Er verstand darunter jede spezifisch induzierte Reaktionsänderung, gleichgültig, ob sich diese in Überempfindlichkeit oder Unterempfindlichkeit oder "in inniger Verbindung beider Zustände miteinander äußert".

"Heute verstehen wir unter Allergie eine durch Kontakt mit immunogenen (antigenen) Substanzen erworbene, gegenüber der Norm abweichende Bereitschaft, nach erneutem Kontakt mit diesem Antigen mit bestimmten krankhaften Erscheinungen zu reagieren" (Pschyrembel, 87).

Erste Versuche auf dem Gebiet des experimentellen, allergischen Kontaktekzems machte CASH (16), als er im Jahr 1911 Sensibilisierungsversuche mit ostindischem Atlasholz an Menschen durchführte.

ZINSER (110) schlug 1921 vor, die Überempfindlichkeitsreaktionen nach der Geschwindigkeit des Reaktionsablaufs zu unterscheiden.

Im Jahr 1923 wurde von WEDROFF (27) erstmals das chemisch relativ einfache Ekzematogen Dinitrochlorbenzol (DNCB) als kontaktsensibilisierende Substanz

erwähnt.

LANDSTEINER und CHASE führten 1942 ihre Übertragungs-experimente durch. Sie konnten zeigen, daß bei der immunologischen Spättypreaktion humorale Antikörper keine Rolle spielen. (50).

1942 zeigte SCHNITZER - unter Verwendung von 1-Chlor-2,4-Dinitrobenzol (DNCB) - daß der Sensibilisierungserfolg bei epikutaner Applikation von der Konzentration des Antigens, d. h. der Menge des Antigens im Verhältnis zur Kontaktfläche abhängt und von der absoluten Antigenmenge weitgehend unabhängig ist (94).

FREY untersuchte 1951 das experimentelle DNCB-Kontaktekzem (epikutan) am Meerschweinchen quantitativ, d. h. er beurteilte den Sensibilisierungsgrad der Tiere nach der schwächsten Antigen-Konzentration (Schwellendosis), die gerade noch eine positive Reaktion hervorrief (25).

1964 konnte TURK (103) am Meerschweinchen zeigen, daß Methotrexat^R bei aktiver Sensibilisierung eine positive Testreaktion unterdrückt.

1.2 Epikutantestung und Immunstatus

Die von JADASSOHN (37) erdachte, epikutane Testung gehört bis heute unter den in vivo Hauttests zu den wichtigsten Nachweismethoden einer zellvermittelten Immunreaktion.

Neben TURK (102 - 105), MAGUIRE und MAIBACH (60 - 65) und HUNZIKER (34, 35) haben sich auch eine Vielzahl anderer Autoren (1, 5, 36, 40, 81, 84, 88, 91) mit der Erforschung der immunbiologischen Wirkungen von Zytostatika im Rahmen des tierexperimentellen, allergischen Kontaktekzems befaßt. Bei vielen Untersuchungen wurde 1-Chlor-2,4-Dinitrobenzol (DNCB) als primäres Antigen, d. h. als ein Antigen, mit dem der Organismus vorher keinen Kontakt hatte, verwendet.

Alle Autoren konnten mittels epikutaner Testung immunsuppressive Wirkungen verschiedener Zytostatika registrieren.

1.3 Ziel der Arbeit

Bei bisherigen Arbeiten über das tierexperimentelle Kontaktekzem wurden die Versuchstiere mit hoher, meist toxischer ein-, höchstens zweimaliger Applikation sensibilisiert, und die immunbiologische Wirkung der jeweils getesteten Substanz wurde allein an der Stärke der 14 - 25 Tage danach ausgelösten Testreaktion beurteilt. Probleme bei der Beurteilung des Immunstatus auf Grund der Testreaktion bereiteten vor allem folgende zwei Punkte:

- Eine durch toxische Sensibilisierungsapplikation induzierte Toleranz täuschte eine Immunsuppression vor (25, 28, 35, 47, 52, 53, 59, 84).
- Die Wertung der Stärke einer einmalig ausgelösten Testreaktion (allergische Kontaktdermatitis) war von subjektiven Eindrücken des Beurteilenden geprägt.

Ziel der vorliegenden Arbeit sollte sein, ein geeignetes Modell zu entwickeln, um die Wirkung immunsuppressiver und immunregulativer Substanzen auf die zelluläre Abwehr (Immunstatus) überprüfen zu können.

Als neuer Parameter für die Messung des afferenten Schenkels der Spättypreaktion sollte die Zeitdauer von der ersten Applikation des Allergens bis zum ersten Auftreten einer sichtbaren Reaktion gemessen werden. Dies ist die

DNCB - Kontakt - Allergie - Zeit,

kurz DNCB-KAZ genannt (107).

2. MATERIAL UND METHODE

2.1 DNCB-Kontakt-Allergie-Zeit (KAZ) - Methode

Zur in vivo Testung des Immunstatus wurde die Methode der DNCB-Kontaktallergiezeit entwickelt und angewandt (47, 107). Es handelt sich dabei um eine epikutane Testmethode, mittels der man die Zeitspanne von der ersten Applikation eines Allergens (DNCB) bis zum ersten Auftreten einer sicht- und tastbaren Testreaktion, auf 24 Stunden genau, messen kann. Die Zeitdauer der Sensibilisierungsphase (=DNCB-KAZ) mit dem primären Allergen DNCB wurde als Maß für den Immunstatus der Versuchstiere benutzt.

2.2 Versuchstiere

Die Untersuchungen wurden an insgesamt 114 Albino-Meerschweinchen (Stamm Pirbright White) mit einem Alter von 3 - 4 Monaten und 400 - 500 g Gewicht durchgeführt (Abb. 1).

Die Tiere wurden bei Ernährung mit Altromin M Pellets und Wasser ad libitum jeweils zu zweien in Käfigen der Größe 36 - 32 - 20 cm gehalten. Die Epilierung der Tiere erfolgte mit einer Schermaschine der Marke "Aesculap Elektra". Auf Wachs-epilation oder eine Naßrasur wurde wegen möglicher Hautirritationen bzw. wegen möglicher allergischer Reaktionen verzichtet.

2.3 DNCB - Epikutantest

2.3.1 Testmaterialien

Zur Durchführung der Epikutantests wurde das Neo-antigen 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol (DNCB) in Salben-

form (DNCB in Eucerinum anhydricum), als Immunsuppressiva Dacarbazin^R (DTIC) und Methotrexat^R und als immunregulatorische Substanz das synthetische Pentapeptid TP-5 gewählt.

2.3.1.1 DNCB in Salbenform

Das Allergen DNCB wurde in Anlehnung an die von BURG und BRAUN-FALCO (13) beschriebene Methode in Salbenform mittels eines handelsüblichen Allergie-Testpflasters (Al-Test, imeco ab, Södertälje, Schweden) aufgebracht. Es besteht aus einer Alufolie, auf deren Mitte sich ein kreisförmiges Filterpapier mit 1 cm Durchmesser befindet (Abb. 2).

Die Testfläche hat eine Größe von 78,5 mm². Die DNCB-Salbe wurde mittels 1 ml-Einmal-Tuberkulinspritzen (Asik I/S, Dänemark) auf eine Testfläche des Patchtests aufgebracht. So ließ sich die verwendete Menge sehr exakt dosieren.

Das mit Salbe versehene Testpflaster wurde auf ein jeweils markiertes Hautareal auf dem Rücken und den Flanken der Tiere aufgebracht und mittels eines Zirkulärverbandes aus gut hautverträglichem "Fixomull" verschiebefest auf der Meerschweinchenhaut für jeweils 24 Stunden fixiert (47).

Die verwendete DNCB-Salbe hatte eine primär nicht toxische Konzentration von 0,1% (13, 25, 47).

Pro Testpflaster wurde eine DNCB-Menge von 5×10^{-2} mg verabreicht. So ergibt sich bei einer Testfläche von 78,5 mm² eine DNCB-Menge pro Flächeneinheit von

$$\begin{aligned} 0,5\text{mg} : 78,5 \text{ mm}^2 &= 6,4 \times 10^{-4} \text{ mg/mm}^2 \\ &= 6,4 \times 10^{-5} \text{ g/cm}^2 \end{aligned}$$



Abb. 1: Meerschweinchen mit Epikutantestpflaster-Verband

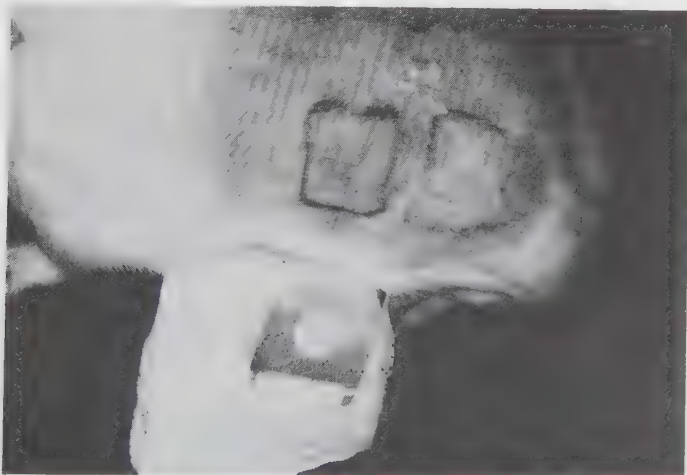


Abb. 2: Markiertes Hautareal auf der Flanke eines
Meerschweinchens und Epikutantestpflaster-
verband

2.3.1.2 Immunsuppressive und immunregulative Substanzen

Zur Immunsuppression wurden Dacarbazin^R (DTIC-Dome, Miles Laboratories, Ltd., Division Dome, Stoke Court, Stoke Poyes, Slojgh, Bucks, Engl.) und Methotrexat^R (Cynamid GmbH, Wolfratshausen, Lederle Arzneimittel) (51) verabreicht.

Als Immunregulativ wurde das synthetische Pentapeptid TP-5 verwendet, das die Cilag-Chemie Ltd., Schaffhausen, Schweiz freundlicherweise zur Verfügung stellte. Das synthetische Pentapeptid TP-5 ist mit der Aminosäuresequenz 32-36 des physiologischen Thymushormons Thymopoietin identisch (Abb. 3).

Alle verwendeten Pharmaka wurden den Tieren in Lösung intraperitoneal unter sterilen Kautelen verabreicht.

Dacarbazin^R und TP-5 wurden täglich, Methotrexat^R wöchentlich gegeben.

2.3.2 Applikationsmodus

Um die Zeitspanne von der ersten Applikation bis zum ersten Auftreten einer sichtbaren Testreaktion auf 24 Stunden genau messen zu können, wurden die Tiere nach dem in Abb. 4 dargestellten Schema behandelt. Auf die in der Abbildung bezifferten Hautareale auf dem Rücken bzw. der Flanke eines Meerschweinchens wurde jeweils am 1., 3., 5., 6., 7., ... Tag für 24 Stunden ein Epikutanpflaster mit 0,05 ml einer 0,1%igen DNCB-Salbe aus einer Tuberkulinspritze angelegt (Abb. 2).

Da jeder neue Verband über einem neuen Hautareal aufgebracht wurde, war jede DNCB-Applikation einerseits eine erneute Sensibilisierungs-dosis und an-

THYMOPOIETIN

32 33 34 35 36
(1-31) - ARG - LYS - ASP - VAL - TYR - (37-49)



TP - 5

SYNTHETISCHES PENTAPEPTID

Abb. 3: Aminosäuresequenz des synthetischen
Pentapeptids TP-5 (93)

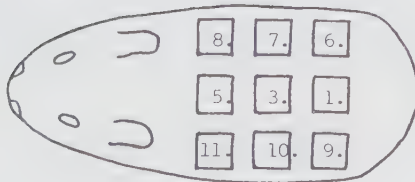


Abb. 4: Schema der Applikationslokalisation nach
Tagen

dererseits gleichzeitig auch eine Testdosis für eine eventuell eintretende Sekundärreaktion.

2.3.3 Beurteilung der Testreaktion

Das jeweils behandelte Hautareal wurde 15 - 20 Minuten nach Entfernung des Testpflasters auf eine positive Immunreaktion im Sinne eines allergischen Kontaktekzems beurteilt. Als positive Reaktion wurde ein deutlich sichtbares Erythem mit Infiltrat gewertet, und die Zeitdauer seit der ersten, erfolgten Sensibilisierungsdosis notiert. Trat dies beispielsweise am 10. Tag ein, dann mußten hier zur Ermittlung der DNCB-KAZ 24 Stunden abgezogen werden, da der Organismus bereits 24 Stunden zuvor sensibilisiert gewesen sein mußte, um am darauffolgenden Tag mit einer positiven Sekundärantwort reagieren zu können.

Um falsch positive Resultate zu vermeiden, wurde nach jeder "ersten positiven Reaktion" noch mindestens ein weiteres Mal eine Epikutantestreaktion ausgelöst und 24 Stunden später beurteilt.

2.4 Versuchsdurchführung

Insgesamt 98 Meerschweinchen wurden in fünf Versuchsreihen auf 17 Gruppen verteilt. Die Anzahl der Tiere in den einzelnen Gruppen lag zwischen vier und sechzehn.

2.4.1 DNCB-KAZ und DNCB-Sensibilisierungskonzentration

24 weibliche Albino-Meerschweinchen (Stamm Pirbright White) wurden willkürlich auf fünf Gruppen verteilt, Gruppe I - IV mit jeweils vier Tieren, Gruppe V mit 8 Tieren.

Den Gruppen I, II und III wurde nach dem in Abb. 4 dargestellten Applikationsschema von Gruppe I bis III in ansteigender Konzentration DNCB-Salbe, gemäß der DNCB-KAZ (2.3.2) auf einem Epikutanpflaster aufgebracht und für jeweils 24 Std. auf dem Hautareal belassen.

Den Tieren der Gruppe IV wurde vom 1. bis 6. Tag jeweils täglich 0,25 ml einer 0,1%igen DNCB-in Aceton-Lösung auf eine markierte, rasierte Stelle im Nacken appliziert. Ab dem 7. Tag wurde die Gruppe IV wie die Gruppe II weiterbehandelt.

Gruppe V wurde von Anfang an wie Gruppe II behandelt und zusätzlich an den Tagen 1, 3, 5, 7 und 9 mit der kosmetischen Enthaarungscreme Pilca^R (Olivin, Hamburg) epiliiert.

In Tab. 1 sind die verabreichten Dosen DNCB in der Versuchsreihe DNCB-Sensibilisierungskonzentration zusammengestellt.

2.4.2 DNCB-KAZ - Geschlechtsunterschied

16 weibliche Albino-Meerschweinchen bildeten die Gruppe VI und 8 männliche die Gruppe VII.

Beide Gruppen wurden nach der DNCB-KAZ und dem in Abb. 4 von S. 9 dargestellten Applikationsschema mit einer Salbenkonzentration von 0,1% (vergl. Gruppe II unter 2.4.1) bis zum Auftreten einer positiven Hautreaktion behandelt.

Tabelle 1: DNCB-Sensibilisierungskonzentrationen der 1. Versuchsreihe (siehe Kap. 2.4.1)

Gruppe	n	DNCB-Salbe ab 1. Tag (ml)		DNCB-in Aceton (ml)
	24	0,05%	0,10% 0,50%	0,10%
Gr. I	4	0,05		
Gr. II	4	0,05		
Gr. III	4		0,05	
Gr. IV	4	0,05 ab 7. Tag		0,25 1.-6.Tag
Gr. V	8	0,05		

Sensibili-
sierungskon-
zentrationen
(%)

Enthaarung der Gruppen I - IV mit Schermaschine (Aesculap Elektra)
Enthaarung der Gruppe V mit Pilca^R-Enthaarungscreme (Olivin, Hamburg)
DNCB-Salbe = DNCB in Eucerinum anhydricum

2.4.3 DNCB-KAZ und Dacarbazin (DTIC^R-Dome)

12 weibliche Meerschweinchen wurden willkürlich in drei Gruppen zu je vier Tieren aufgeteilt. Jedes Tier wurde nach der DNCB-KAZ-Methode, nach dem bereits dargestellten Applikationsschema und einer DNCB-Salbenkonzentration von 0,1% behandelt und erhielt zusätzlich an den ersten fünf aufeinanderfolgenden Tagen Dacarbazin (DTIC^R-Dome) intraperitoneal nach dem in Tab. 2 dargestellten Schema.

Tabelle 2: Applikationsschema DNCB-KAZ und Dacarbazin (DTIC^R-Dome)

Gruppe	n	DNCB-Salbe ab 1. Tag 0,1% (ml)	Dacarbazin mg/kg Körpergewicht i. p. pro Tag	TD
Gruppe VIII	4	0,05	4,0	1 x
Gruppe IX	4	0,05	40,0	10 x
Gruppe X	4	0,05	200,0	50 x

TD = mittlere therapeutische Dosis bei malignem Melanom
19,7 ml der Injektionslösung enthielten 200 mg
Dacarbazin, 200 mg Zitronensäure und 75 mg Mannit.

2.4.4 DNCB-KAZ und Methotrexat^R (MTX)

18 weibliche Albino-Meerschweinchen wurden willkürlich auf 4 Gruppen verteilt. Zur Sensibilisierung wurden die Tiere nach der DNCB-KAZ-Methode nach dem in Abb. 4 aufgezeigten Applikationsschema

und einer DNCB-Salbenkonzentration von 0,1% behandelt. Zusätzlich erhielten die Tiere, mit Ausnahme der Kontrolltiere Methotrexat^R in Lösung intraperitoneal nach dem in Tab. 3 beschriebenen Schema. Die erste Methotrexatdosis wurde am 2. Tag, also 24 Stunden nach der Erstapplikation des sensibilisierenden Allergens DNCB verabreicht.

Tabelle 3: Applikationsschema
DNCB-KAZ und Methotrexat^R (MTX)

Gruppe	n	MTX mg/kg Körpergewicht i. p. pro Woche	TD
Gruppe XI	4	--	--
Gruppe XII	4	0,7	1 x
Gruppe XIII	4	7	10 x
Gruppe XIV	6	47	1/2 LD 50

MTX = Methotrexat^R (Lederle, Wolfratshausen)

TD = mittlere therapeutische Dosis

1/2 LD₅₀ = 1/2 Dosis letalis Maus

50 mg Methotrexat wurde in 20 ml sterilem Wasser gelöst.

Drei Tieren der Kontrollgruppe XI wurde 18 Tage nach den ersten Auftreten einer positiven Testreaktion, also nach erfolgreicher Sensibilisierung gegen DNCB jeweils 47 mg Methotrexat^R pro Kilogramm Körpergewicht intraperitoneal gespritzt.

Etwa 30 Minuten später wurde gemäß der DNCB-KAZ eine DNCB-Flächendosis von $6,4 \times 10^{-4}$ mg/mm² mittels eines Testpflasters epikutan appliziert.

2.4.5 DNCB-KAZ, Methotrexat^R und TP-5 (synthetisches Pentapeptid)

20 weibliche Albino-Meerschweinchen wurden willkürlich auf vier Gruppen verteilt. Alle Tiere wurden nach der DNCB-KAZ-Methode mit dem in Abb. 4 dargestellten Applikationsschema und einer DNCB-Salbenkonzentration von 0,1% behandelt.

Die Gruppen XV und XVI erhielten täglich TP-5 in zwei verschiedenen Dosierungen (10 und 25 mg/die i.p.). Den beiden anderen Gruppen XVII und XVIII wurde wöchentlich Methotrexat^R (47 mg/kg Körpergewicht i. p.) und zusätzlich täglich zwei verschiedene Dosen TP-5 verabreicht. Die Dosierungen sind in Tab. 4 dargestellt.

Tabelle 4: DNCB-KAZ, Methotrexat^R und TP-5

Gruppe	n	MTX mg/kg Körpergewicht i.p. pro Woche	TP-5 mg/die i. p.
Gruppe XV	4	--	25
Gruppe XVI	6	--	10
Gruppe XVII	6	47	25
Gruppe XVIII	4	47	10

MTX = Methotrexat^R

TP-5 = synthetisches Pentapeptid

2.5 Statistische Methode

Um die Ergebnisse der einzelnen Gruppen statistisch untereinander vergleichen zu können, wurde der Mann-Whitney-Test gewählt. Dieser Test erlaubt einen parameterfreien Vergleich zwischen zwei unabhängigen Stichproben und ist auch als sog. "U-Test" bekannt. Im Test wurde nach folgenden Gleichungen vorgegangen:

$$U_1 = mn + \frac{m(m+1)}{2} - R_1 \quad \text{Wobei } n \text{ und } m \text{ Fallzahl und } R_1 \text{ Rangsumme sind.}$$

$$U_2 = mn + \frac{n(n+1)}{2} - R_2 \quad \text{Wobei } n < m \text{ ist.}$$

$$U = \text{MIN} (U_1, U_2)$$

Die kritischen Werte von U sind für die jeweils erforderliche Irrtumswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit von den Fallzahlen m und n tabelliert (106).

3. ERGEBNISSE

3.1 Standardisierung der DNCB-KAZ (Kontrolle)

3.1.1 DNCB-KAZ und DNCB-Salbenkonzentration

(Gruppen I - V)

Bei den Tieren der Gruppen I - V, deren Behandlungsmethode unter 2.4.1 erläutert ist, ergaben sich folgende Ergebnisse:

Bei Gruppe I verstarb am 14. Tag ein Tier, ohne daß sich eine positive Hautreaktion gezeigt hatte. Als auch die anderen drei Tiere dieser Gruppe bis zum 21. Tag nach Erstapplikation keine eindeutig positive Reaktion zeigten, wurde der Versuch bei dieser Gruppe am 21. Tag abgebrochen.

In Gruppe II zeigten sich bei drei Tieren am 9. und bei einem Tier am 10. Tag positive Hautreaktionen.

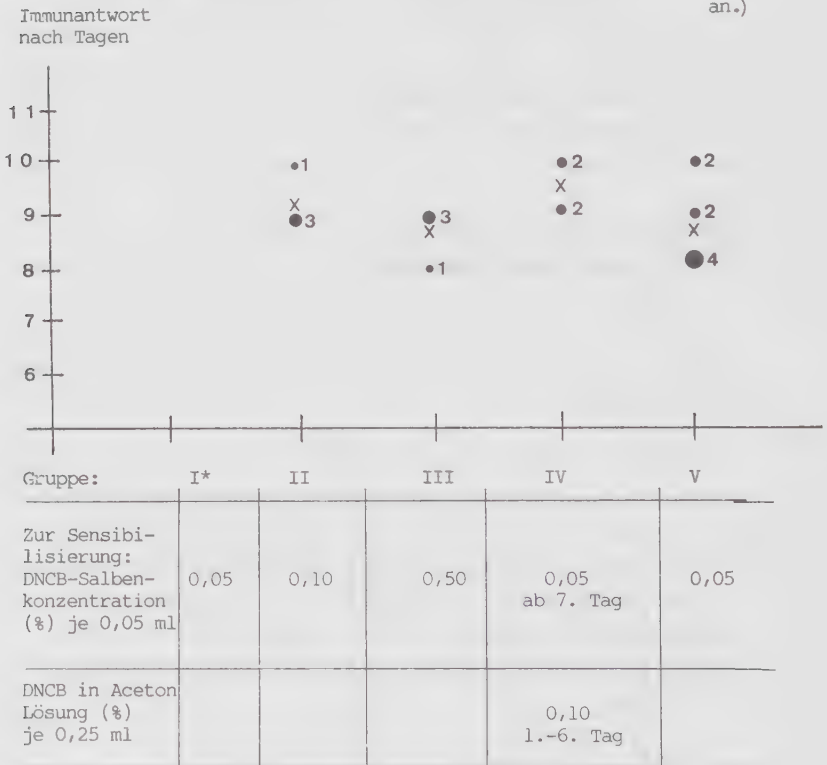
Bei Gruppe III traten bereits am zweiten bzw. dritten Tag bei drei von vier Tieren unklare Erytheme auf. Eindeutige Reaktionen, d. h. Erytheme mit Infiltrat traten bei einem Tier am 8. und bei drei Tieren am 9. Tag auf.

Bei Gruppe IV ergaben sich bei zwei Tieren am 9. Tag und bei zwei Tieren am 10. Tag positive Epikutantestreaktionen.

In der Gruppe V reagierten vier Tiere am 8. Tag, zwei Tiere am 9. Tag und zwei Tiere am 10. Tag positiv.

Die Ergebnisse der Gruppen I - V sind in Abb. 5 dargestellt.

Abb. 5: Zeitdauer (Tage) bis zum Auftreten einer positiven Epikutantestreaktion in Abhängigkeit von der DNCB-Sensibilisierungskonzentration (Die Zahlenangaben innerhalb des Koordinatenkreuzes geben die Zahl der Versuchstiere an.)



* Bis zum 21. Tag nach Erstapplikation keine positive Testreaktion.

Die Enthaarung der Tiere der Gruppen I - IV erfolgte mit einer Schermaschine (Aesculap Elektra), der Gruppe V mit Pilca^R-Enthaarungscreme (Olivin, Hamburg)

DNCB-Salbe = DNCB in Eucerinum anhydricum

3.1.2 DNCB-KAZ - Geschlechtsunterschied (Gruppe VI und VII)

Bei den Gruppen VI und VII, deren Behandlungsmethode unter Punkt 2.4.2 dargestellt ist, zeigten sich folgende Ergebnisse:

Ein Meerschweinchen der Gruppe VI verstarb am 7. Tag und ging nicht in die Wertung ein.

Bei den restlichen 15 Tieren der Gruppe VI ergaben sich bei 12 Tieren nach neun Tagen, bei zwei nach 10 Tagen und bei einem nach acht Tagen positive Testreaktionen. Der Mittelwert beträgt 9,1 Tage.

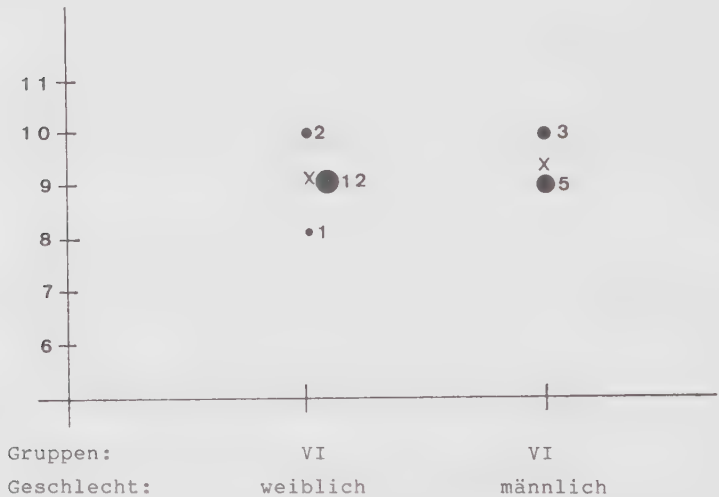
Von den Meerschweinchen der Gruppe VII reagierten fünf nach neun Tagen und drei nach 10 Tagen positiv. Es ergibt sich demnach ein Mittelwert von 9,4 Tagen.

In Abb. 6 sind die Ergebnisse der Gruppen VI und VII als Diagramm aufgeführt.

In einem Vergleich der Gruppe VI (weibliche Meerschweinchen) mit der Gruppe VII (männliche Meerschweinchen) zeigt sich in den Mittelwerten der DNCB-KAZ ein Unterschied von nur 0,3 Tagen.

Abb. 6: Zeitdauer (Tage) bis zum Auftreten einer positiven Epikutantestreaktion in Abhängigkeit vom Geschlecht der Versuchstiere (Die Zahlen im Koordinatenkreuz beziehen sich auf die Anzahl der Versuchstiere)

Immunantwort
nach Tagen



Alle Tiere wurden nach der DNCB-KAZ-Methode (je 0,05 ml einer 0,10%igen DNCB-Salbe) behandelt.

DNCB-Salbe = DNCB in Eucerinum anhydricum

3.2 Einfluß immunsuppressiver und immunmodulierender Substanzen auf die DNCB-KAZ

3.2.1 Dacarbazin (DTIC^R-Dome)

Alle Tiere der Gruppe X starben am fünften Tag nach Versuchsbeginn.

Drei Tiere der Gruppe IX starben am 11. Tag und ein Tier am 12. Tag.

Kein Tier beider Gruppen zeigte eine positive Testreaktion.

Bei zwei Tieren der Gruppe VIII wurden am 11. Tag und bei zwei am 12. Tag positive Testreaktionen beobachtet. Diese vier Tiere, die bei Beendigung des Versuches einen Teil ihres Fellkleides verloren hatten und auch eine reduzierte Vitalität aufwiesen, erholten sich in den folgenden zwei Wochen.

3.2.2 Methotrexat^R (MTX)

Alle mit Methotrexat^R behandelten Tiere überlebten den Versuch. Ein Tier der Kontrollgruppe (Gruppe XI) verstarb am 6. Tag. Die anderen drei Tiere dieser Gruppe zeigten jeweils am 9. Tag eine positive Testreaktion.

Drei Tiere der Gruppe XII reagierten am 10. Tag positiv, ein Tier am 11. Tag.

In Gruppe XIII ergab sich bei drei Tieren am 11. Tag und bei einem Tier am 12. Tag eine positive Testreaktion.

Bei drei Tieren der Gruppe XIV wurden am 14. Tag und bei drei Tieren am 15. Tag positive Epikutan-Testreaktionen beobachtet.

Bei den drei mit Methotrexat^R behandelten Gruppen ergab sich eine dosisabhängige Immunsuppression, d. h. eine dosisabhängige, zeitliche Verzögerung des Auftretens einer positiven Testreaktion gegenüber der Kontrollgruppe.

Die mit Methotrexat^R behandelten Tiere wiesen nur geringe Nebenwirkungen im Sinne eines leichten Haarausfalls und einer geringen Gewichtsreduzierung auf. Beides bildete sich rasch zurück.

Die drei sensibilisierten Tiere der Kontrollgruppe (Gruppe XI), die 18 Tage nach erfolgter Sensibilisierung mit Methotrexat^R behandelt wurden, und denen ein epikutan Testpflaster appliziert wurde (zur Methode siehe auch 2.4.4), reagierten alle drei bereits nach 24 Stunden mit einer allergischen Testreaktion.

Methotrexat^R führte bei nicht sensibilisierten Meer-schweinchen zu einer dosisabhängigen Immunsuppression, bei bereits sensibilisierten Tieren jedoch wurde die Immunantwort nicht verzögert.

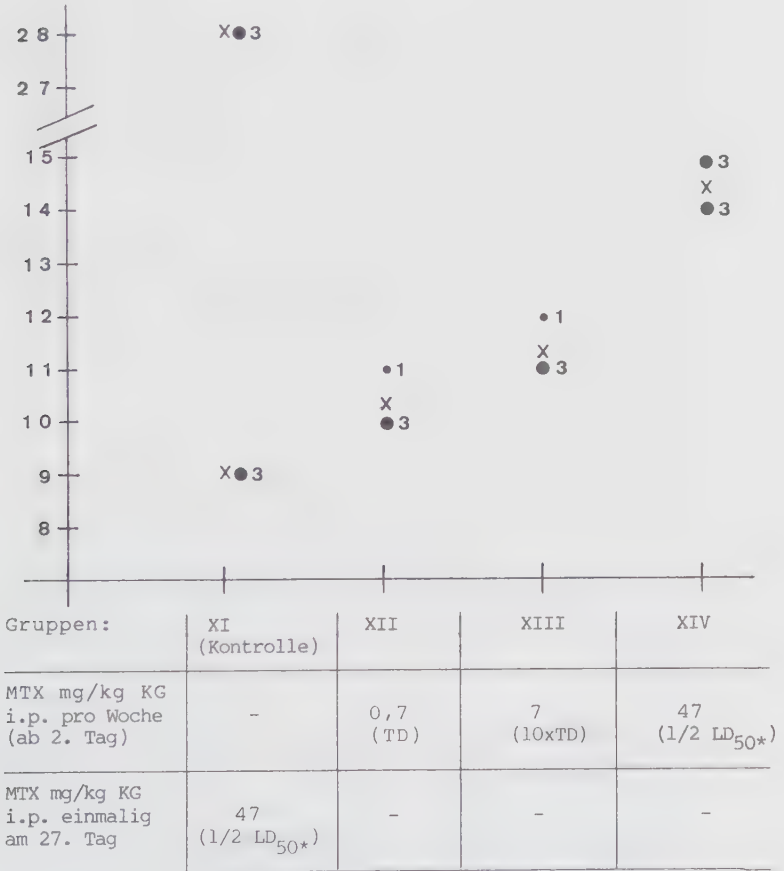
Die Ergebnisse der Tiere der Gruppen XI - XIV sind in Abb. 7 aufgeführt.

3.2.3 Methotrexat^R (MTX) und TP-5 (synthetisches Pentapeptid)

Bei den Tieren der Gruppe XV, die neben der DNCB-KAZ-Methode mit täglich 25 mg TP-5 i. p. behandelt

Abb. 7: Zeitdauer (Tage) bis zum Auftreten einer positiven Epikutantestreaktion in Abhängigkeit von der Methotrexatdosis (Die Zahlen im Koordinatenkreuz beziehen sich auf die Zahl der Versuchstiere.)

Immunantwort
nach Tagen



* = Maus
MTX = Methotrexat
KG = Körpergewicht
TD = mittlere therapeutische Dosis

Alle Tiere wurden nach der DNCB-KAZ-Methode (je 0,05 ml einer 0,10%igen DNCB-Salbe) behandelt. Gruppe XI erhielt vom 10. - 26. Tag keine Behandlung.

wurden, trat bei einem Meerschweinchen nach sieben Tagen und bei drei nach acht Tagen eine positive, epikutane Testreaktion ein.

Bei den Tieren der Gruppe XVI, die neben der DNCB-KAZ-Methode täglich 10 mg TP-5 i. p. erhielten, wurde bei vier Tieren nach sieben Tagen und bei zwei Tieren nach sechs Tagen eine positive, epikutane Testreaktion registriert.

Bei den Tieren der Gruppe XVII, die neben der DNCB-KAZ-Methode wöchentlich Methotrexat^R (47 mg/kg Körpergewicht i. p.) und täglich TP-5 (25 mg i. p.) erhalten hatten, zeigte ein Tier nach neun Tagen, drei Tiere nach zehn Tagen und zwei Tiere nach elf Tagen positive Testreaktionen.

Ähnliche Ergebnisse ergaben sich bei Gruppe XVIII, die neben der DNCB-KAZ-Methode mit wöchentlich Methotrexat^R (47 mg/kg Körpergewicht i. p.) und täglich TP-5 (10 mg i. p.) behandelt worden waren. Ein Tier dieser Gruppe wies nach zehn Tagen, drei Tiere wiesen nach elf Tagen positive, epikutane Testreaktionen auf.

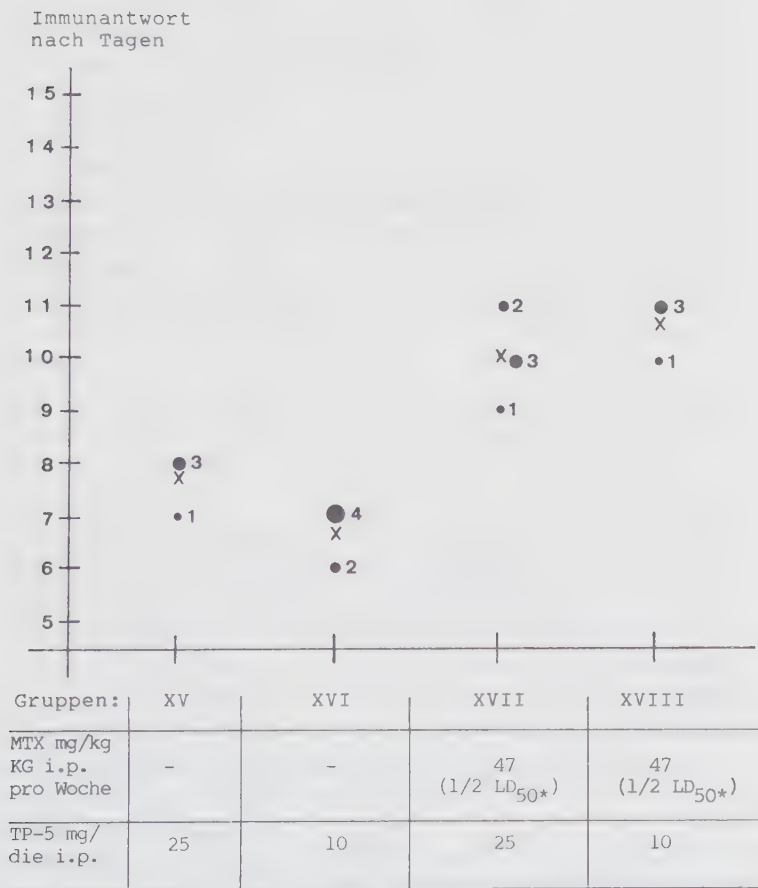
Das Diagramm in Abb. 8 zeigt die Ergebnisse der Gruppen XV - XVIII.

3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Ergebnisse, die in fünf aufeinanderfolgenden Versuchsreihen gewonnen wurden, sollen hier noch einmal übersichtlich zusammengefaßt werden.

Die 30 Kontrolltiere (Gruppen II, VI, VII, XI), die

Abb. 8: Zeitdauer (Tage) bis zum Auftreten einer positiven Epikutantestreaktion in Abhängigkeit von der TP-5 (synthetisches Pentapeptid)-Dosis bei Immunsuppression durch Methotrexat (Die Zahlen im Koordinatensystem beziehen sich auf die Zahl der Versuchstiere)



* = Maus
KG = Körpergewicht
MTX = Methotrexat
TP-5 = synthetisches Pentapeptid

Alle Tiere wurden nach der DNCB-KAZ-Methode (je 0,05 ml einer 0,10%igen DNCB-Salbe) behandelt.

nach der DNCB-KAZ-Methode (vergl. 2.3 ff.) behandelt wurden, zeigten eine mittlere DNCB-Kontakt-Allergie-Zeit von 9,2 Tagen.

Die Tiere der Gruppe VIII, die zusätzlich täglich DTIC^R (4mg/kg Körpergewicht i. p.) erhielten, reagierten im Durchschnitt nach 11,5 Tagen positiv.

Bei den Tieren der Gruppen XII, XIII und XIV, die neben der DNCB-KAZ-Methode wöchentlich Methotrexat^R (Gruppe XII 0,7 mg, Gruppe XIII 7 mg und Gruppe XIV 47 mg/kg Körpergewicht i. p.) erhielten, ergaben sich mittlere DNCB-KAZ-Werte, die in der Tabelle 5 dargestellt sind.

Tabelle 5: DNCB-KAZ-Werte unter Methotrexat^R-Behandlung

Gruppe	MTX mg/kg KG i.p. pro Woche	DNCB-KAZ (Tage)
Gruppe XII	0,7	10,3
Gruppe XIII	7	11,3
Gruppe XIV	47	14,5

In den Gruppen XV und XVI, denen zusätzlich zur DNCB-KAZ-Methode täglich TP-5 (Gruppe XV 25 mg i.p., Gruppe XVI 10 mg i. p.) verabreicht wurde, wurden mittlere DNCB-KAZ-Werte von 7,8 bzw. 6,7 Tagen registriert. Es wird also eine Verkürzung der DNCB-KAZ von 1,4 bzw. 2,5 Tagen gegenüber den Kontrolltieren festgestellt.

Bei den Tieren der Gruppen XVII und XVIII, die außer der DNCB-KAZ-Methode wöchentlich Methotrexat^R (47 mg pro kg Körpergewicht i. p.) und täglich TP-5 (Gruppe XVII 25 mg i. p., Gruppe XVIII 10 mg i. p.) erhielten, ergaben sich mittlere DNCB-KAZ-Werte von 10,2 (Gruppe XVII) und 10,3 Tagen (Gruppe XVIII).

In Tabelle 6 und Abb. 9 sind die Ergebnisse der einzelnen Gruppen zusammengefaßt und dargestellt.

3.4 Statistische Überprüfung der Ergebnisse

Die gewonnenen Ergebnisse wurden mittels des Mann-Whitney-Tests (Methode vgl. Kap. 2.5) statistisch überprüft.

Die mittleren Unterschiede zwischen den Kontrolltieren (Gruppen II, VI, VII, XI) und den Gruppen VIII (Dacarbazin-DTIC^R), XII, XIII, XIV (Methotrexat^R) und XV, XVI (synthetisches Pentapeptid TP-5) sind auf dem 1% Niveau, zwischen der Gruppe XIV (47 mg/kg Körpergewicht Methotrexat^R i. p. pro Woche) und den Gruppen XVII und XVIII (47 mg/kg Körpergewicht Methotrexat^R i. p. pro Woche und zusätzlich 25 bzw. 10 mg TP-5 pro Tag) ebenfalls auf dem 1% Niveau signifikant.

In der Tabelle 7 sind die Signifikanz-Niveaus der einzelnen Gruppen noch einmal in einer Übersicht zusammengefaßt.

Tab. 6: Zusammenfassung der Ergebnisse, DNCB-KAZ in verschiedenen Versuchsansätzen

	Gruppen: II, VI, VII, XI (Kontrolle)									
n = 68	30	4	4	4	4	6	4	6	6	4
DTIC mg/kg		4,0								
KG i.p. pro Tag		(TD)								
MTX mg/kg			0,7	7	47				47	47
KG i.p. pro Woche			(TD)	(10xTD)	(1/2LD ₅₀ *)				(1/2LD ₅₀ *)	(1/2LD ₅₀ *)
TP-5 mg/die i.p.							25	10	25	10
Immunantwort nach Tagen	9,2	11,5	10,3	11,3	14,5	7,8	6,7	10,2	10,8	

Alle Tiere wurden nach der DNCB-KAZ-Methode behandelt (je Applikation 0,05 ml 0,10%ige DNCB-Salbe).

DTIC = Dacarbazin^R

MTX = Methotrexat^R

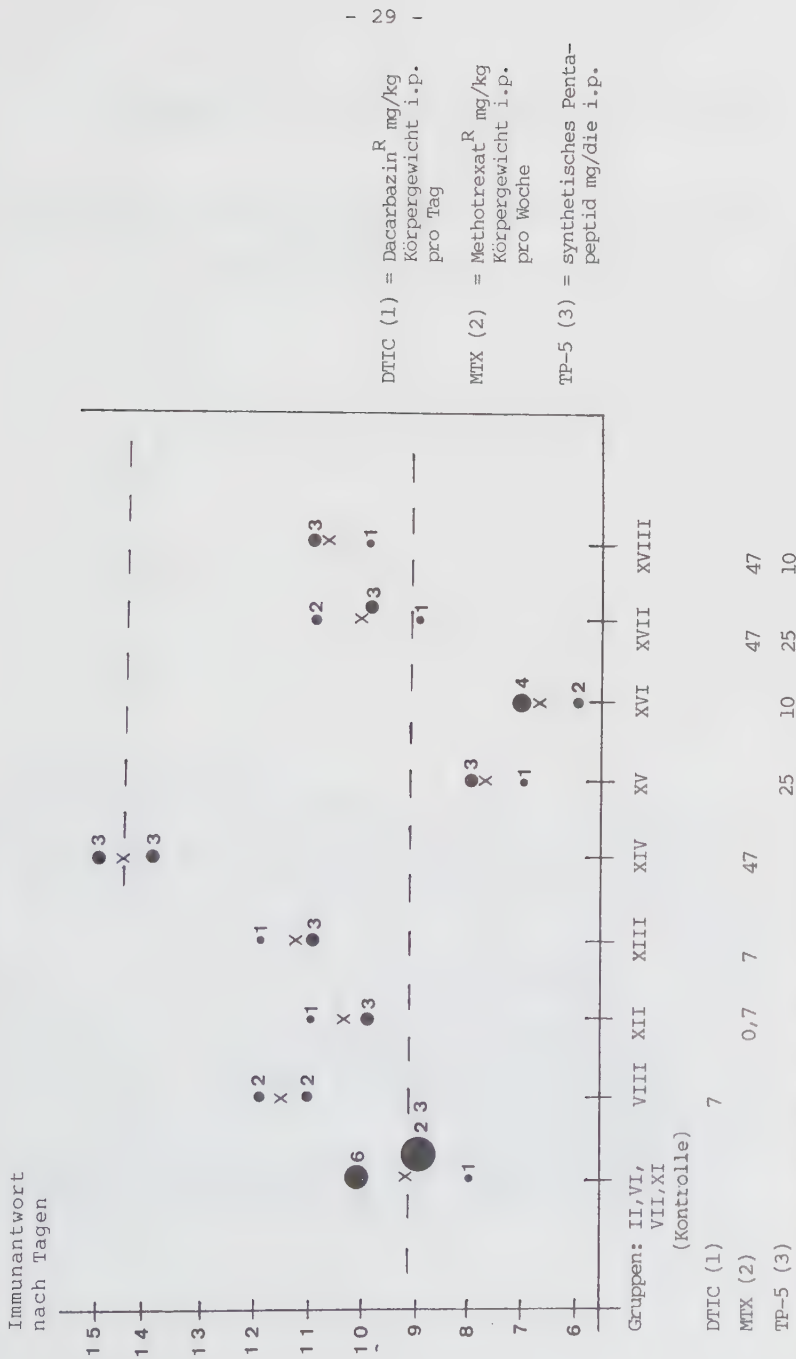
TP-5 = synthetisches Pentapeptid

TD = mittlere therapeutische Dosis

KG = Körpergewicht

* = Maus

Abb. 9: Zusammenfassung der Ergebnisse, DNCB-KAZ in verschiedenen Versuchsansätzen (vgl. dazu auch Tab. 6)



Alle Tiere wurden nach der DNCB-KAZ-Methode behandelt (je Applikation 0,05 ml 0,10%ige DNCB-Salbe).

Tab. 7: Statistischer Vergleich der Ergebnisse

Gruppen	n=68	p im Vergleich mit Kontrolltieren	p im Vergleich mit Gruppe XIV ₄
II, VI,VII, XI (Kontrolle)	30	---	---
VIII ₁	4	$\leq 0,01$	---
XII ₂	4	$\leq 0,01$	---
XIII ₃	4	$\leq 0,01$	---
XIV ₄	4	$\leq 0,01$	---
XV ₅	4	$\leq 0,01$	---
XVI ₆	6	$\leq 0,01$	---
XVII ₇	6	---	$\leq 0,01$
XVIII ₈	4	---	$\leq 0,01$

Als statistische Methode wurde der Mann-Whitney-Test gewählt (vergl. Kap. 2.5).

Alle Tiere wurden nach der DNCB-KAZ-Methode behandelt (je 0,05 ml 0,10%ige DNCB-Salbe).

DTIC^R = Dacarbazin^R
 MTX = Methotrexat^R
 TP-5 = synthetisches Pentapeptid

- 1 4 mg/kg Körpergewicht DTIC^R i.p. pro Tag
- 2 0,7 mg/kg Körpergewicht MTX i.p. pro Woche
- 3 7 mg/kg Körpergewicht MTX i.p. pro Woche
- 4 47 mg/kg Körpergewicht MTX i.p. pro Woche
- 5 25 mg/die TP-5 i.p.
- 6 10 mg/die TP-5 i.p.
- 7 47 mg/kg Körpergewicht MTX i.p. pro Woche und 25 mg/die TP-5
- 8 47 mg/kg Körpergewicht MTX i.p. pro Woche und 10 mg/die TP-5

4. DISKUSSION

4.1 Die allergische Kontaktdermatitis

4.1.1 Die allergische Kontaktdermatitis als Immunreaktion vom verzögerten Typ

Die allergische Kontaktdermatitis wird nach der Einteilung von GELL und COOMBS dem Typ IV einer Immunreaktion zugeordnet (18). Es handelt sich um eine immunologische Hautreaktion vom verzögerten Typ.

Im Gegensatz zu den Typen I, II, und III sind bei Typ IV nicht humorale, im Serum nachweisbare Antikörper, sondern überwiegend Zellen der T-Lymphozytenreihe Reaktionspartner des Antigens und somit Träger des pathogenetischen Prinzips (6, 9, 84, 95, 98). Die zellvermittelte Immunreaktion ist also durch Serum nicht übertragbar, wohl aber durch Lymphozyten oder Milzzellsuspension (50).

Ein weiterer Unterschied liegt in der Tatsache, daß bei der Kontaktallergie die Zeit vom Erstkontakt mit dem Allergen bis zum ersten Auftreten einer Überempfindlichkeit mindestens 5 - 7 Tage beträgt, wogegen man Antikörper gewöhnlich nicht vor 14 Tagen deutlich nachweisen kann. Außerdem benötigt bei der zellvermittelten Reaktion der bereits sensibilisierte Organismus bei erneutem Kontakt mit dem Allergen etwa 24 Stunden zum Erreichen einer deutlich sichtbaren Hautreaktion, wogegen antikörpervermittelte Reaktionen bereits nach wenigen Stunden (Arthus Phänomen) oder sogar nach einigen Minuten (Urtikaria, Anaphylaktischer Schock) zu beobachten sind (6, 84, 95).

4.1.2 Phasen der kontaktallergischen Reaktion

Man kann bei der Kontaktallergie drei Phasen unterscheiden:

In der ersten Phase wird das Antigen "bereitet" und "bereitgestellt", in der zweiten Phase erfolgt die Bildung sensibilisierter T-Zellen (Effektorzellen) und in der dritten, der sog. Auslösungsphase entwickelt sich, falls erneut das Allergen zugeführt wird, die allergische Entzündung, die eigentliche Immunreaktion (6, 84, 95, 98).

Die beiden ersten Phasen lassen sich zur Sensibilisierungs- oder auch Induktionsphase zusammenfassen und werden auch als "afferenter Weg" bezeichnet. Entsprechend spricht man bei der Auslösungsphase auch vom "efferenten Weg" (6, 95).

4.1.3 Sensibilisierungsphase

4.1.3.1 DNCB als Hapten

Diese Phase beginnt mit dem Erstkontakt des Allergens, d. h. mit der erstmaligen Penetration der Substanz in die Epidermis durch das Stratum corneum hindurch. Die Fettlöslichkeit einer Substanz steht meist in direktem Verhältnis zu ihrer allergenen Potenz.

Die meisten Kontaktallergene, wie auch 1-Chlor-2,4-Dinitrobenzol (DNCB: Molekulargewicht 202,55) sind chemisch definierte Verbindungen mit kleinem Molekulargewicht und vermögen dadurch zwar die Barriere der Hornschicht zu durchdringen, sind aber als Haptene nicht in der Lage, eine Immunantwort hervorzurufen (84, 95). Dazu ist die Konjugation des Haptens an strukturierte oder gelöste Proteine bzw. Polypeptide als Träger

(Carrier) erforderlich. Obwohl die Natur des Trägerproteins noch diskutiert wird und auch noch nicht geklärt ist, ob bestimmte Proteine mit bestimmten Haptenen bevorzugt reagieren, ist die chemische Art der Reaktion für DNCB bekannt (Abb. 10).

Als Träger der Carriermoleküle kommen in ersten Linie Makrophagen und Langerhans-Zellen in Betracht. Auf welche Weise das mittels seines Carriers in der Art eines Ia-Antigens an den Langerhans-Zellen gebundene Antigen den T-Lymphozyten übergeben wird, ist noch unbekannt.

Für eine periphere Sensibilisierung im Sinne MEDAWARS (68) sprechen auch Befunde von MACHER und CHASE (54, 55). Die Konjugation des Allergens an den Carrier und dadurch die Umwandlung vom Hapten zum Vollantigen erfolgt in etwa 24 Stunden.

4.1.3.2 Proliferationsphase im regionären Lymphknoten

Die zweite, auch zentrale Phase, läuft im regionären Lymphknoten ab. Wie die Information über die allergene Substanz in den regionären Lymphknoten gelangt, ob als Hapten - Trägereiweißkomplex an der Oberfläche eines Lymphozyten oder nach Phagozytose des Vollantigens durch Makrophagen (Langerhans-Zellen) oder auf direktem lymphogenem Weg, ist noch Gegenstand der Forschung.

Ist die Information in den regionären Lymphknoten gelangt, werden in der thymusabhängigen Region des Lymphknotens durch große Lymphoblasten Klone von spezifisch sensibilisierten T-Lymphozyten gebildet. Diese Proliferation dauert etwa fünf Tage, bis zwei verschie-

dene Subpopulationen von sensibilisierten T-Lymphozyten in die Zirkulation entlassen werden (47, 84).
Siehe dazu Abb. 11.

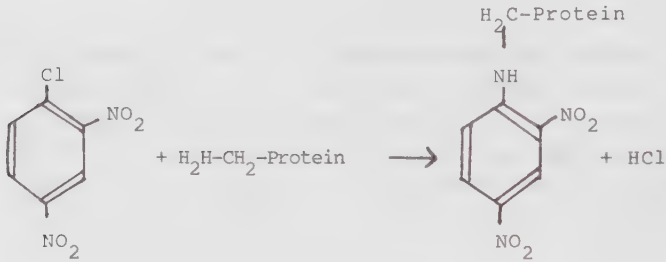


Abb. 10: Reaktion des Haptens DNFB mit der freien Aminogruppe eines Proteins (42)

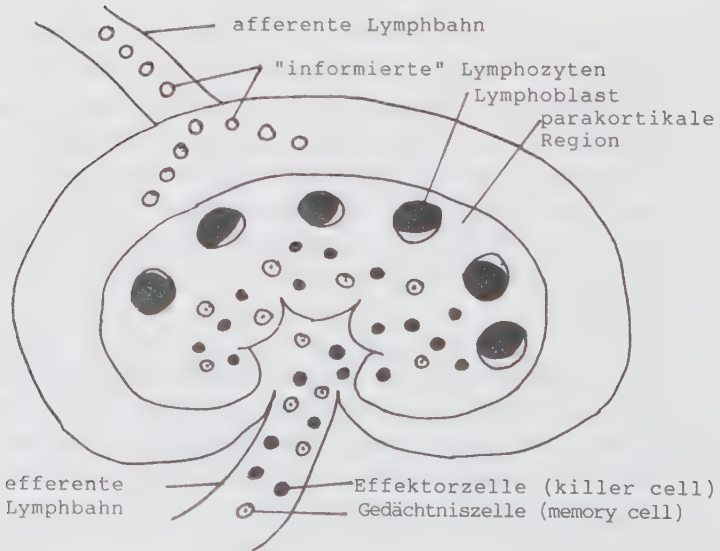


Abb. 11: Proliferationsphase im regionären Lymphknoten
(47, 84)

Die eine Population zirkuliert zwischen thymusabhängigen Regionen der Lymphknoten, der Milz und der Lymphwege und trägt die Information des Erstkontakts mit dem Antigen. Diese Zellen bezeichnet man als Gedächtniszellen (memory cells). Bei einem erneuten Kontakt mit demselben Antigen sind sie fähig, in eine neue Population von sensibilisierten T-Lymphozyten zu proliferieren und sich zu differenzieren (booster effect) (84).

Die andere Subpopulation, die ihren Ursprung in der parakortikalen Zone der Lymphknoten hat, sind die Effektorzellen (killer cells). Man findet sie vorwiegend im peripheren Blut, und sie besitzen die Fähigkeit, bei einem Antigenkontakt zu reagieren und Lymphokine freizusetzen, die die inflammatorische Hautreaktion induzieren.

Mit der Entlassung der sensibilisierten T-Lymphozyten aus dem regionären Lymphknoten werden innerhalb weniger Tage auch die anderen Lymphknoten über das Antigen "informiert" und produzieren ihrerseits dann spezifisch sensibilisierte T-Lymphozyten. Damit ist die Induktion der Kontaktallergie abgeschlossen, und der gesamte Organismus ist sensibilisiert.

4.1.4 Auslösungsphase

Kommt der sensibilisierte Organismus nun erneut mit dem Allergen in Kontakt, so trifft das Vollantigen nach einigen Stunden verzögert auf durch die Haut "streifende" sensibilisierte Effektorzellen. Der Rezeptor auf der Lymphozytenoberfläche verbindet sich mit dem entsprechenden Rezeptor des Hapten-Protein-Konjugats, führt so zu Membranänderungen und bedingt

die Ausschüttung von Lymphokinen. Diese Mediatoren mit Proteincharakter und einem Molekulargewicht von 30.000 bis 70.000 bewirken letztlich die entzündliche Hautreaktion (47, 84).

4.2 Beurteilung der epikutanen Sensibilisierungsreaktion auf DNCB und ihre Abhängigkeit von verschiedenen Faktoren

4.2.1 Dauer der Sensibilisierungsphase

Ziel der Arbeit war es, ein Modell zu entwickeln, das geeignet ist, den Immunstatus bzw. die Abwehrlage des Organismus sowie Einflüsse von Pharmaka auf die zelluläre Abwehr zu überprüfen. Das Modell sollte nicht zu komplex sein und in vivo angewandt werden können. Da die Zeit als Parameter der Sensibilisierungsphase gemessen werden sollte und nicht, wie bisher, die Stärke der Auslösereaktion (28, 34, 47, 52, 53, 59, 84), mußte eine Methode gefunden werden, mit der sich der Zeitpunkt einer eingetretenen Sensibilisierung messen ließ.

Nach BORK (6) hängt die Dauer der Sensibilisierungsphase, das ist die Zeit zwischen dem Erstkontakt des Allergens und der frühestmöglichen klinischen Antwort der Haut mit einer allergischen Kontaktdermatitis, von folgenden Faktoren ab:

1) der Potenz des Allergens

Die starke, allergene Potenz des gewählten Haptens DNCB ist bekannt (7, 8, 13, 25, 26, 28, 29, 34, 45, 47, 52, 53, 54, 55, 56, 59, 84, 85, 94, 95,97).

- 2) der Konzentration des Allergens, unter deren individueller Schwelle keine Sensibilisierung, übrigens auch keine Auslösung einer allergischen Kontaktdermatitis erfolgt:

Die in den Versuchen verwendete Konzentration an DNCB wurde in Vorversuchen ermittelt. Sie erwies sich als sicher nicht toxisch und andererseits als sicher ausreichend, um eine Sensibilisierung hervorzurufen (7, 8, 13, 25, 47, 52, 85, 86, 94). Nach den Versuchen von SCHULZE (95) wissen wir, daß für den Sensibilisierungserfolg die pro Hautflächeneinheit aufgebrauchte Menge eines Allergens entscheidend ist und nicht die absolute Dosis.

- 3) der Häufigkeit, Zeitdauer und Intensität des Kontaktes

Vor allem HUNZIKER (34) und auch MAGNUSSON und KLIGMAN (59) zeigten, daß der Erfolg einer Sensibilisierung sehr wohl von der Häufigkeit, der Zeitdauer der Applikation und auch der Intensität des Kontaktes des Allergens abhängt.

- 4) der vorhandenen Barrierefunktionen der Haut

Sowohl HUNZIKER (34) als auch MAGNUSSON und KLIGMAN (59) verwendeten DNCB, gelöst in Aceton. In eigenen Vorversuchen (16 Meerschweinchen wurden über 15 Tage durch tägliches Auftropfen einer Acetonlösung am rechten Ohr behandelt. 8 Tiere erhielten 0,05 ml einer 0,1%igen DNCB in Acetonlösung, 8 Tiere 0,05 ml Acetonlösung ohne DNCB) und auch von anderen Autoren (47, 52) wurde eine hautirritierende Wirkung des Aceton festgestellt. Diese Wirkung nimmt mit der Häufigkeit der Applikation an derselben Stelle zu. So wird eine exakte

Beurteilung des jeweils behandelten Hautareals erschwert. Auch scheint Aceton zu einer "Austrocknung" und "Entfettung" der Hautoberfläche zu führen, was wiederum die Penetration des Allergens DNCB durch das Corium erschweren könnte.

Für eine Verwendung von DNCB in Salbenform (13) spricht auch die bessere Dosierbarkeit und die bessere Applizierbarkeit auf ein genau definiertes Hautareal. Dies scheint besonders wichtig, da nicht die verwendete Konzentration eines Allergens, sondern die pro Hautflächeneinheit aufgebraachte Haptenmenge für den Sensibilisierungserfolg ausschlaggebend ist (95).

- 5) der individuellen Empfänglichkeit der Haut gegenüber einer Kontaktallergie

Selbstverständlich hängt der Sensibilisierungserfolg nicht nur von der Penetration der allergenen Substanz ab, sondern auch von deren Bindungsfähigkeit mit Gewebsproteinen in der Haut (42).

4.2.2 Allergen-wirksamer Anteil der applizierten DNCB-Dosis

MACHER und CHASE (54, 55, 56) konnten mit C¹⁴ markiertem DNCB bei intrakutaner Applikation zeigen, daß 90% des injizierten Allergens bereits nach einer Stunde den Injektionsort verlassen hatten. Nach zwölf Stunden hatten sogar 99% des DNCB den Injektionsort verlassen. Dieser minimale Rest jedoch, der offenbar an ortsständige Gewebskomponenten gebunden ist, verläßt die Haut mit diesen in den nächsten vier bis fünf Tagen. Dies fällt zeitlich mit der Induktionsphase zusammen, was zu dem Schluß führt, daß dieser Teil des applizierten Allergens für den Sensibilisierungsvorgang bedeutungsvoll ist.

4.2.3 Versuchstiere

Bei den Untersuchungen von MAGNUSSON und KLIGMAN (59) wurden weibliche Versuchstiere bevorzugt, da sie weniger aggressiv als gleichaltrige Männchen sind und sich nicht so leicht gegenseitig die Haut verletzen, was die zur Verfügung stehende Hautfläche einschränken würde.

Die verwendeten Tiere waren alle zwischen drei und vier Monate alt, da in diesem Alter das Immunsystem der Meerschweinchen voll entwickelt ist (34, 59, 75). Auch wurde darauf geachtet, daß die Tiere möglichst alle gleich schwer waren, da sich schon dadurch signifikante Einflüsse auf die Ergebnisse ergeben könnten (59).

4.2.4 Applikationsort

Die Entscheidung, ein jeweils neues Hautareal bei jeder neuen Applikation des Haptens zu behandeln, brachte zwei Vorteile:

- Erstens wurde so eine mögliche Kumulation der allergenen Substanz am Applikationsort verhindert und
- zweitens wurde es dadurch möglich, ein jeweils nicht vorbehandeltes Hautareal zu beurteilen.

Die eingetretene Immunantwort mußte also durch die 24 Stunden zuvor applizierte Allergenmenge ausgelöst worden sein, was sich bei Applikation immer an derselben Stelle nicht eindeutig feststellen läßt.

4.2.5 Entfernung der Haare

Eine zentrale Rolle beim experimentellen Kontaktekzem des Meerschweinchens spielt die Art der Entfernung der Haare. Die verwendete Methode darf die Haut nur so wenig als möglich reizen, da sonst Fehlinterpretationen denkbar sind.

Von einer Wachsepilation (59) wurde wegen der enormen Reizung der Haut, die sich erst nach etwa drei Tagen zurückbildet, abgesehen.

Auch eine Naßrasur birgt zu viele Gefahren der Hautschädigung.

Eine Entfernung der Haare mit einem kosmetischen Mittel (z. B. Pilca^R) bringt zwar eine sehr sauber epilierte Haut, jedoch muß die sehr aufwendige Prozedur alle zwei bis drei Tage wiederholt werden, da die Haare sehr rasch nachwachsen. Auch besteht die Gefahr unspezifischer Hautreizungen oder gar möglicher allergischer Reaktionen durch darin enthaltene chemische Substanzen.

So erwies sich als geeigneteste Methode das Scheren der Tiere mit einem feinen Scherkopf. Das jeweilige Hautareal wurde so vor jeder Applikation epiliert.

4.2.6 DNCB in nicht toxischer Konzentration

Es sollte die Dauer der Sensibilisierungsphase, gemessen in Tagen, als Parameter zur Beurteilung des Immunstatus eingeführt werden.

In Versuchen zur DNCB-Salbenkonzentration wurde eine Menge an DNCB pro Hautflächeneinheit von $6,4 \times 10^{-4}$ mg/mm² als geeignet gefunden. Diese Do-

sierung zeigte bei etwa 1000 verabreichten Applikationen nie eine toxische Reaktion und war aber in der Lage, alle behandelten Tiere zu sensibilisieren. Diese Dosierung gilt selbstverständlich nur für DNCB in Eucerinum anhydricum und für die hier verwendete Methode (47, 52, 107).

4.2.7 Beurteilung der epikutanen Testreaktion

Die Methode, die Stärke der Auslösereaktion bei verschiedenen Konzentrationen zu beurteilen, hat den Nachteil, daß die nach CHASE (59) eingeführten Stärkegrade gewöhnlich fließend ineinander übergehen. Auch ist die Stärke der Auslösereaktion von einer Reihe anderer Faktoren abhängig:

- Von der individuellen Hautbeschaffenheit des jeweiligen Tieres an der jeweiligen Stelle
- vom Allgemeinzustand der Tiere
- von der individuellen Beurteilung durch den "abzulesenden" Beobachter

Es ist also äußerst schwierig, bei einer Einteilung nach Stärkegraden (59) zu objektiven Ergebnissen zu kommen.

Bei der DNCB-KAZ-Methode war es relativ gleichgültig, wie stark die jeweilige Immunantwort ausfiel, entscheidend war allein ihr Auftreten. Es scheint einleuchtend zu sein, daß eine Entscheidung, ob überhaupt eine Reaktion vorliegt oder nicht, einfacher zu fällen ist als eine semiquantitative Einteilung einer Hautreaktion nach Stärkegraden. Eine nicht eindeutige Hautreaktion wurde in allen Versuchen als negativ beurteilt.

4.3 DNCB-Kontakt-Allergie-Zeit und Immuntoleranz

Da gerade in den letzten Jahrzehnten das Problem der Immuntoleranz auch am Modell der experimentellen Kontaktdermatitis untersucht wurde, soll auch hier darauf eingegangen werden (29, 33, 47, 55, 62, 81, 84, 103).

Immuntoleranz wird heute nicht mehr als passiver, sondern als aktiver Vorgang, hervorgerufen durch Suppressorzellen, angesehen (55, 62, 84, 102, 103). Man nimmt an, daß bei Applikation eines Haptens gleichzeitig ein allergener und ein tolerogener Prozeß in Gang gesetzt werden. Die Immunantwort ist also das Ergebnis eines Gleichgewichtes zwischen Effektor- und Suppressormechanismus. Eine positive Immunantwort erfolgt, wenn der Effektormechanismus einen höheren Grad erreicht als der Suppressormechanismus. Werden jedoch die Suppressorelemente mehr stimuliert, so resultiert eine spezifische Immuntoleranz (84).

MACHER und CHASE (54) stellten bei intrakutanen Injektionen von C^{14} markiertem DNCB fest, daß die anfänglich abströmende, große Fraktion (nach zwölf Stunden etwa 99%) toleranzinduzierend, die für etwa fünf Tage gewebsfixierte kleinere Fraktion vorwiegend allergieinduzierend wirkt.

Bei allen nach der DNCB-KAZ-Methode behandelten Tieren konnte nie eine Reaktion im Sinne einer spezifischen Immuntoleranz beobachtet werden. Alle Tiere wurden sensibilisiert, die mit Immunsuppressiva behandelten reagierten lediglich verzögert.

Eine mögliche Erklärung für die hundertprozentige

Sensibilisierung und das bei keinem Tier beobachtete Auftreten einer Immuntoleranz könnte sein, daß die in Vorversuchen ermittelte Dosis pro Hautflächeneinheit von $6,4 \times 10^{-4}$ mg/mm² gerade groß genug zu sein scheint, um das Gleichgewicht zwischen toleranzinduzierender und sensibilisierender Wirkung auf die Seite der Sensibilisierung verschieben zu können. Ein mit nur einer einmaligen Applikation dieser Dosierung sensibilisiertes Tier zeigt entsprechend entweder nur eine relativ schwache oder eine klinisch nicht eindeutig beurteilbare Immunreaktion (47, 52). Durch die erneuten Allergenapplikationen in den folgenden Tagen jedoch scheint sich das Gleichgewicht immer mehr in Richtung der Sensibilisierung zu stabilisieren. Da die Induktionsphase der allergischen Kontaktdermatitis jedoch vier bis fünf Tage in Anspruch nimmt (6, 84, 95), kommen für eine Stabilisierung höchstens die ersten drei Applikationen der DNCB-KAZ-Methode in Betracht.

Eine Aufflammreaktion ("Flare-up"-Reaktion) (6) konnte bei keinem Tier festgestellt werden. Eine Aufflammreaktion wäre z. B. an der Stelle des Erstkontaktes durch Reste der sensibilisierenden Substanz, beim Auftreten einer positiven Immunreaktion an anderer Stelle denkbar.

4.4 Die DNCB-Kontaktallergiezeit (KAZ) zur Beurteilung der epikutanen Sensibilisierbarkeit

4.4.1 Meßgenauigkeit der DNCB-KAZ

Bei den Kontrolltieren ergab sich im Mittel eine Immunantwort nach 9,2 Tagen mit einer Standardabweichung von $\pm 0,5$ Tagen. Dieser bemerkenswert einheit-

liche Wert scheint auf den ersten Blick überraschend. Mögliche individuelle Unterschiede in der Sensibilisierbarkeit werden aber durch die mehrmalige Applikation primär nicht toxischer Konzentrationen im Laufe der Induktionsphase offensichtlich ausgeglichen.

Bei Applikation von einmaligen, primär toxischen Dosen treten individuelle Sensibilisierungsprädispositionen stärker in Erscheinung (25, 28, 34, 59, 84).

Da bei jedem Tier beim Eintreten einer positiven Reaktion mindestens ein weiteres Mal eine Immunreaktion ausgelöst wurde, konnte manchmal ein Stärkerwerden der Reaktion vom Tag vorher festgestellt werden. In solchen Fällen war möglicherweise bei der Applikation das jeweilige Tier noch nicht ausreichend sensibilisiert, um mit einer klinisch sichtbaren Immunantwort zu reagieren. Eine für die Auslösung einer makroskopisch beurteilbaren Hautreaktion nötiger Sensibilisierungszustand wurde vielleicht erst sechs oder zwölf Stunden nach Aufbringen der Testkonzentration erreicht, so daß die Auslösereaktion in diesen speziellen Fällen nicht 24 Stunden für die Ausbildung einer Effloreszenz hatte, sondern nur zwölf oder 18 Stunden.

Dies scheint bei oberflächlicher Betrachtung ein Nachteil der DNCB-KAZ-Methode zu sein. Es ist jedoch vielmehr ein Indiz dafür, daß sich mit dieser Methode der frühestmögliche Zeitpunkt einer positiven Immunreaktion nach Abschluß der Sensibilisierungsphase auch wirklich messen läßt.

4.4.2 Beeinflussung der DNCB-KAZ durch Dacarbazin (DTIC^R)

Bis heute ist der genaue Wirkungsmechanismus des Dacarbazin unbekannt. Es werden folgende drei Thesen diskutiert:

- 1) Hemmung der DNS-Synthese als Purinanalogen
- 2) Wirkung als alkylierendes Mittel
- 3) Wechselwirkung mit SH-Gruppen

Möglicherweise hat es auf allen drei Ebenen Angriffspunkte. Als Zytostatikum wirkt es natürlich besonders in Geweben mit einer erhöhten Zellteilungsrate. So könnte die immunsuppressive Wirkung ihren Ursprung in einer allgemeinen Lymphozytopenie haben. Hämatopoetische Nebenwirkungen wurden bereits an Melanompatienten nachgewiesen (46).

In eigenen Versuchen ließ sich eine immunsuppressive Wirkung des Dacarbazin nachweisen. Zwei Tiere der Gruppe VIII (4 mg Dacarbazin/kg Körpergewicht i. p. pro Tag = TD*) zeigten am 11. Tag (zwei Tage verzögert) und zwei Tiere am 12. Tag (drei Tage verzögert) eine positive Testreaktion.

Da alle Tiere der Gruppe IX (40 mg Dacarbazin/kg Körpergewicht i. p. pro Tag = 10 x TD*) und Gruppe X (200 mg Dacarbazin/kg Körpergewicht i. p. pro Tag = 50 x TD*) starben, wurde von weiteren Versuchen mit Dacarbazin (DTIC^R) abgesehen.

Der Tod der Tiere aus Gruppe X am 5. Tag könnte durch eine lokale, toxische Wirkung der Injektionslösung, die einen pH von drei bis vier hatte, bedingt sein. Hierbei ist zu berücksichtigen, daß den Tieren dieser Gruppe fünf Tage lang täglich 9 ml Flüssigkeit intraperitoneal appliziert wurde. Diese spekulative, to-

* TD = Therapeutische Dosis

xische Wirkung der Lösung würde durch die absolute Menge der Lösung unterstrichen.

Da bei der Gruppe IX die Tiere erst am 11. bzw. 12. Tag starben, scheint hier nicht nur eine mögliche, lokal toxische Wirkung vorgelegen zu haben, sondern es ließe sich zusätzlich eine, für Dacarbazin (DTIC^R) vermutete, hepatotoxische Wirkung diskutieren.

4.4.3 Einfluß von Methotrexat^R auf die DNCB-KAZ

4.4.3.1 Methotrexat^R - Dosierung

In den eigenen Versuchen wurde eine Methotrexat^R-Dosierung von 0,7 mg pro kg Körpergewicht i. p. pro Woche (Gruppe XII) gewählt. Diese Dosierung entspricht der therapeutischen Dosierung (TD) bei Patienten mit malignem Melanom. Den Tieren der Gruppe XIII wurde das Zehnfache dieser therapeutischen Dosierung (7 mg pro kg Körpergewicht i. p. pro Woche) verabreicht, und die Tiere der Gruppe XIV erhielten die sehr hohe Dosis von 47 mg pro kg Körpergewicht i. p. pro Woche (= 1/2 Dosis letalis Maus).

Alle Dosierungen wurden in Anlehnung an therapeutisches Vorgehen beim Menschen wöchentlich gegeben (vgl. Kap. 2.4.4).

Andere Autoren verabreichten Methotrexat^R täglich und verwendeten daher Dosen von nur etwa 10 mg/kg Körpergewicht (1, 35, 103).

Da bereits am ersten Tag etwa 50 - 75% der verabreichten Dosis nahezu unverändert über die Nieren ausgeschieden werden, erscheint auch eine sehr hohe Dosierung tolerierbar.

Bei den mit Methotrexat^R behandelten Tieren der Gruppen XII - XIV ließ sich mit der DNCB-KAZ-Methode eine dosisabhängige, immunsuppressive Wirkung feststellen. Das bedeutet, daß die registrierten DNCB-Kontakt-Allergie-Zeiten umso länger waren, je höher die applizierte Methotrexat^R-Dosis gewählt worden war (vgl. Kap. 3.2.2).

4.4.3.2 Zeitpunkt der Methotrexat^R - Applikation

Methotrexat^R ist ein Folsäureantagonist und bewirkt eine intrazelluläre FH_4 -Verarmung, aus der eine Hemmung der Synthesen von DNS, RNS und Proteinen resultiert (51).

Eine entscheidende Rolle der immunsuppressiven Wirkung spielt der Zeitpunkt der Applikation in Beziehung zur Allergengabe. Methotrexat^R blockiert sowohl die Entstehung einer allergischen Kontaktdermatitis als auch die Primärantwort bei der humoralen Immunität (30, 36, 61, 69, 91).

TURK stellte an aktiv gegen Oxazolan und Picrylchlorid sensibilisierten Meerschweinchen fest, daß Methotrexat^R eine Sensibilisierung blockiert, wenn eine Fünftagesgabe am 2. bis 4. Tag nach der Einmalsensibilisierung begonnen wurde (103). Wurde mit der Methotrexat^R-Gabe später als am 6. Tag begonnen, ließ sich eine Sensibilisierung nicht mehr unterdrücken.

Ähnliches stellte er auch für Cyclophosphamid fest. Bei Tieren, die acht Tage lang mit Methotrexat^R behandelt wurden, war eine passive Sensibilisierung durch Transfusion von Lymphzellen von sensibilisierten Spendern möglich. Methotrexat^R verhinderte also, solange es gegeben wurde, eine aktive Sensibilisierung;

eine passive Sensibilisierung konnte es jedoch nicht unterdrücken (30, 103). Dies wurde in eigenen Versuchen bestätigt (vgl. Kap. 3.2.2).

Drei gegen DNCB sensibilisierte Meerschweinchen (Gruppe XI) erhielten 18 Tage nach erfolgter Sensibilisierung Methotrexat^R (47 mg/kg Körpergewicht i. p. pro Woche), und gleichzeitig wurde den Tieren ein epikutanes Testpflaster mit einer DNCB-Salbenkonzentration von 0,1% appliziert. Alle drei Versuchstiere reagierten bereits nach 24 Stunden mit einer allergischen Testreaktion.

HUNZIKER sensibilisierte Meerschweinchen durch tägliche Applikation von 1% DNCB in Aceton im Nacken über zwölf Tage. Gleichzeitig bekamen die Tiere bereits zwei Tage vor der ersten Sensibilisierungsdosis für insgesamt 24 Tage täglich 2,25 mg Methotrexat^R intraperitoneal verabreicht. Am letzten Tag einer Methotrexat^R-Gabe reagierten alle Tiere auf einen Auslöse-test negativ. Eine erneute Testung, zehn Tage später, zeigte positive Reaktionen (35).

Beide Autoren zeigten, daß sich eine immunologische Spättypreaktion beim Meerschweinchen durch Methotrexat^R verzögern läßt. Da sie jedoch Methotrexat^R täglich und bis zu 24 Tage lang verabreichten, während dieser Zeit aber nur anfangs das Allergen applizierten, konnte sich eine Immunsuppression entwickeln.

Verschiedene Untersuchungen mit Cyclophosphamid als Immunsuppressivum führten zu dem heute allgemein anerkannten Nachweis von Suppressorzellen (14, 15, 60, 62, 63, 64, 65, 79, 80, 82, 84, 104).

POLAK erklärt eine verstärkte Auslösereaktion nach Cyclophosphamidgabe damit, daß Suppressorzellen gegen

Cyclophosphamid empfindlicher seien als Effektorzellen, und daß so das Gleichgewicht zugunsten der Effektorzellen verschoben würde. Ein solcher Effekt konnte bis heute jedoch nur bei Cyclophosphamid beobachtet werden.

Verschiedene Autoren (36, 62, 82, 103) vertreten die Meinung, daß Cyclophosphamid bevorzugt auf Zellen mit einer hohen Teilungsrate wirkt, wogegen ruhende Zellen relativ resistent seien. Wichtig scheint aber vor allem der Zeitpunkt der Cyclophosphamidgabe und deren Dosierung.

Gibt man Cyclophosphamid während der Sensibilisierungsphase, so wird der ganze, stimulierte Clon von proliferierenden Zellen im regionären Lymphknoten vernichtet. Dies scheint das Nicht-Erscheinen von großen pyroninophilen Zellen im regionären Lymphknoten in sensibilisierten und mit Cyclophosphamid behandelten Tieren zu unterstreichen.

Wird Cyclophosphamid dagegen drei bis fünf Tage vor der Sensibilisierung gegeben, wenn die für die Kontaktsensibilisierung verantwortlichen Zellen in einer Ruhephase sind, dann sind diese bis zu einem hohen Grad resistent gegen eine solche Behandlung (82).

Eine solche Spezifität konnte bis jetzt bei Methotrexat^R nicht festgestellt werden. Zwar vertreten einige Autoren die Meinung, daß Methotrexat^R besser wirkt, wenn man es bereits zwei Tage vor der Sensibilisierung gibt (30, 35), aber ein solcher Effekt ist auch von der verwendeten Dosierung, der Häufigkeit der Applikation und auch der gewählten Sensibilisierungsmethode abhängig.

Methotrexat^R verhindert nicht das Auftreten von pyroninophilen Zellen (Immunoblasten) im regionären Lymphknoten, sondern behindert die Entstehung einer Population von kleinen Lymphozyten, die von diesen Zellen entstehen (103).

Methotrexat^R verhindert also vor allem die Bildung oder zumindest die Wirksamkeit (Suppressorzellen?) von Effektorzellen.

Da Methotrexat^R im Gegensatz zu Cyclophosphamid nicht das Auftreten von Immunoblasten beeinflußt, kann auch mit Methotrexat^R eine Sensibilisierung letztlich nie verhindert, sondern immer nur, solange es verabreicht wird, nach außen hin unterdrückt werden.

4.4.3.3 Methotrexat^R und T-Lymphozyten

Welchen Einfluß Methotrexat^R auf Subpopulationen von T-Lymphozyten wie Suppressorzellen, T-Helferzellen, Gedächtniszellen besitzt, ist noch Gegenstand der Forschung.

All diese Subpopulationen von T-Lymphozyten stehen, wie fast alle biologischen Systeme, miteinander in einem Fließgleichgewicht. Stellt man sich den ganzen T-Zell-Pool als großes Wasserbecken mit mehreren Zu- und auch Abflüssen vor, so kann eine Erhöhung des Wasserstandes sowohl durch einen verminderten Abfluß als auch durch einen vermehrten Zufluß bedingt sein.

Da bei der DNCB-KAZ-Methode immer wieder neue Sensibilisierungsreize appliziert werden, ist es durchaus denkbar, daß trotz einer Immunsuppression durch Methotrexat^R dieses Gleichgewicht zugunsten einer klinisch sichtbaren Immunreaktion verschoben wird.

Interessant scheint auch der festgestellte, dosisabhängige, immunsuppressive Effekt von Methotrexat^R. Trotz der massiven Dosierung von Methotrexat^R (47 mg/kg Körpergewicht) konnte eine Sensibilisierung nicht verhindert, sondern nur verzögert werden.

Ruft man sich das Modell des Wasserbeckens in Erinnerung, so könnte man sich bei größerer Methotrexat^R-Dosierung auch eine größere Behinderung der einzelnen Zuflüsse denken, was wiederum den Wasserspiegel senken würde, und auf die Sensibilisierungsphase übertragen bedeutet, daß nicht genügend geeignete immunkompetente Zellen entstehen, um auf einen Allergenreiz mit einer adäquaten allergischen Kontaktdermatitis reagieren zu können. Das "Zuflußhindernis" ist umso größer und wird auch umso später beseitigt, je höher die verwendete immunsuppressive Dosis ist.

4.4.4 Einfluß des synthetischen Pentapeptids TP-5 auf die DNCB-Kontaktallergiezeit (KAZ)

Das synthetische Pentapeptid TP-5 (Thymopoietin 32-36) zeigt dem Thymushormon Thymopoietin-ähnliche, biologische Wirkung (32).

KOMURO und BOYSE (48) und auch BASCH und GOLDSTEIN (2, 3) konnten in vitro nachweisen, daß Thymopoietin die Differenzierung von Thymozyten zu reifen T-Lymphozyten im Thymus steuert.

SCHEID und Mitarbeiter zeigten, daß ein Anstieg von zyklischem AMP (cAMP), hervorgerufen durch Thymopoietin, der intrazelluläre Mediator für eine Ausdifferenzierung von Thymozyten zu reifen T-Lymphozyten ist (92).

Eine T-Zell-Differenzierung kann auch durch andere Substanzen, wie Theophylline, das ebenfalls cAMP erhöht, hervorgerufen werden. Jedoch ist dies eine unspezifische Aktivierung, die genauso zu einer B-Zell-Differenzierung führt. Thymopoietin induziert aber eine spezifische T-Zell-Differenzierung und hemmt eine B-Zell-Differenzierung (92).

GOLDSTEIN zeigte, daß TP-5 thymopoietin-ähnliche, biologische Wirkung besitzt (32).

In eigenen Versuchen wurden mit Methotrexat^R (47 mg/kg Körpergewicht pro Woche) immunsupprimierte Meerschweinchen gleichzeitig täglich mit TP-5 (10 bzw. 25 mg i. p.) behandelt.

Bei Tieren, die nur mit Methotrexat^R (47 mg/kg Körpergewicht pro Woche) behandelt worden waren, ergab sich eine mittlere DNCB-KAZ von 14,5 Tagen (vgl. Kap. 3.2.2 und Kap. 3.3).

Bei den Meerschweinchen, die Methotrexat^R und TP-5 erhalten hatten, zeigten sich mittlere DNCB-KAZ von 10,2 bzw. 10,8 Tagen (vgl. Kap. 3.2.3 und Kap. 3.3).

Das Auftreten positiver, allergischer Testreaktionen konnte im Mittel 4,3 bzw. 3,7 Tage früher beobachtet werden, als dies ohne TP-5-Behandlung zu erwarten gewesen wäre. Die immunregulatorische Wirkung des TP-5 hatte also dem immunsuppressiven Effekt des Methotrexat^R entgegengewirkt. Da bis heute die genaue Wirkungsweise von Thymopoietin bzw. TP-5 unbekannt ist, kann auch eine Erklärung dieser Versuchsergebnisse nur versucht werden.

Thymopoietin (TP-5) wirkt wahrscheinlich auf "regulierende Zellen", die darauf zielen, ein Gleichgewicht im "immunologischen Netz" wiederherzustellen. Durch die T-Zell-Stimulierung von TP-5 (Thymopoietin) erscheinen immunkompetente T-Lymphozyten, die nicht von Methotrexat^R supprimiert wurden und so, nachdem sie die Information über das Allergen erhalten haben, in spezifische Effektorzellen proliferieren können. Diese "neuen T-Lymphozyten" könnten die Information über den Hapten-Trägereiweiß-Komplex entweder über die Haut (wiederholte Applikation bei der DNCB-Kontaktallergiezeit) oder möglicherweise von anderen, zwar supprimierten, aber bereits "informierten" Zellen erhalten.

Auch wenn sich der genaue Wirkungsmechanismus nur vermuten läßt, bleibt doch von Interesse, daß TP-5 das Auftreten einer Immunantwort bei mit Methotrexat^R massiv immunsupprimierten und nach der DNCB-Kontaktallergiezeit-Methode behandelten Meerschweinchen annähernd auf "Normalwerte" reguliert.

Daß TP-5 auch am Menschen wirksam ist, zeigt ein Bericht von FIORILLI und Mitarbeitern (21). Sie fanden bei einem 18 Monate alten Kind, das an einer "severe combined immunodeficiency" litt, neben verschiedenen anderen Immundefekten auch eine auffallende Verminderung von T-Lymphozyten. Das Kind wurde darauf acht Monate lang mit dem synthetischen Pentapeptid TP-5 (Thymopoietin 32-36) behandelt. Der klinische Zustand des Patienten besserte sich, und ebenso vermehrte sich die Zahl der T-Lymphozyten. Die humorale Immunität blieb jedoch nach wie vor unterdrückt.

Diese Befunde entsprechen den in vitro gewonnenen Erkenntnissen, und weitere Untersuchungen mit TP-5 scheinen nicht nur im Hinblick auf eine therapeutische Anwendung, sondern auch zur weiteren Aufklärung des immunologischen Geschehens von Interesse zu sein.

5. SCHLUSSFOLGERUNG

Anhand der aufgezeigten Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß die DNCB-Kontakt-Allergie-Zeit (DNCB-KAZ) am vorgestellten Tiermodell eine geeignete Methode zur quantitativen Prüfung der zellulären Abwehr (Immunstatus) darstellt.

Sowohl bei mit immunsuppressiven Substanzen (Dacarbazin bzw. Methotrexat^R) als auch bei mit der immunregulativen Substanz TP-5 (synthetisches Pentapeptid) behandelten Tieren zeigte sich, daß sich mit Bestimmung der primären DNCB-Kontakt-Allergie-Zeit die Wirkung der verwendeten Substanzen auf die zelluläre Immunantwort erfassen ließ.

Erste klinische Untersuchungen wurden an Patienten mit malignen Melanomen durchgeführt (85, 86). Auch hier konnte man unter Anwendung der DNCB-Kontakt-Allergie-Zeit den Status der zellulären Immunität quantitativ in vivo bestimmen.

Die Methode der DNCB-KAZ eignet sich sowohl im Tiermodell (Meerschweinchen) als auch beim Menschen zur quantitativen Bestimmung der zellulären Immunantwort in vivo und ist ein geeignetes Modell für weitere Untersuchungen des Immunstatus unter verschiedenen klinischen, histologischen, prognostischen und therapeutischen Aspekten.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein geeignetes tierexperimentelles Modell zu entwickeln, um die Wirkung immunsuppressiver und immunregulativer Substanzen auf die zelluläre Abwehr (Immunstatus) überprüfen zu können.

Als neuer Parameter für die zelluläre Immunantwort wurde die Dinitrochlorbenzol-Kontakt-Allergie-Zeit (DNCB-KAZ), d. h. die Zeitdauer (Tage) für die erforderliche, wiederholte, epikutane Applikation eines Neoantigens (DNCB) in nicht toxischer Konzentration (0,1%, entsprechend $6,4 \times 10^{-4}$ mg/mm²) bis zum Auftreten einer allergischen Kontaktreaktion bestimmt.

Von insgesamt 114 Albino-Meerschweinchen wurden 78 nach der DNBCB-KAZ-Methode sensibilisiert, und die Zeitdauer (Tage) bis zum Auftreten einer positiven Testreaktion (Erythem mit Infiltrat) registriert. Die Kontrolltiere erhielten keine weitere Behandlung. Bei insgesamt zehn weiteren Gruppen wurde zusätzlich Dacarbazin (DTIC^R) in drei verschiedenen Dosen, Methotrexat^R in drei verschiedenen Dosen, TP-5 (synthetisches Pentapeptid) in zwei verschiedenen Dosen und Methotrexat^R und TP-5 gemeinsam verabreicht.

Bei den Kontrolltieren war eine allergische Reaktion nach einer mittleren DNBCB-KAZ von 9,2 Tagen feststellbar. Bei den Gruppen, die Dacarbazin (DTIC^R) bzw. Methotrexat erhalten hatten, zeigte sich eine zeitliche Verzögerung der Immunantwort, die bei den mit Methotrexat^R behandelten Tieren dosisabhängig war.

Bei den beiden Gruppen, die Methotrexat^R und TP-5 gemeinsam erhalten hatten, ließ sich eine weitgehende Normalisierung der DNCB-KAZ registrieren.

TP-5 allein führte zu einer Verkürzung der DNCB-Kontakt-Allergie-Zeit im Vergleich zu den Kontrolltieren.

Die ermittelten Unterschiede zwischen den Gruppen sind auf dem 1% Niveau signifikant (Mann-Whitney-Test).

Die DNCB-Kontakt-Allergie-Zeit ist eine geeignete Methode zur quantitativen Bestimmung der zellulären Immunantwort in vivo. Im Gegensatz zu anderen Methoden, bei denen eine quantitative Aussage über den Status der zellulären Immunität nur hinsichtlich der Reaktionsstärke der Auslösungsphase möglich ist, wird die zelluläre Immunantwort (Immunstatus) bei der DNCB-Kontakt-Allergie-Zeit anhand der Zeitdauer von der ersten Applikation des Neoallergens bis zum ersten Auftreten einer allergischen Kontaktreaktion beurteilt.

Die DNCB-Kontakt-Allergie-zeit ist ein geeignetes Modell für weitere Untersuchungen des Immunstatus unter verschiedenen klinischen, histologischen, prognostischen und therapeutischen Aspekten.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. D'ARCY HORT, P.; REES, R. J. W.; NIVEN, J. S. F.:
The effect of high dosage of methotrexate,
associated with folinic acid, on the suppression
of tuberculin sensitivity in guinea pigs.
Clin. exp. Immunol. 3, 91-98 (1968)
2. BASCH, R. S.; GOLDSTEIN G.: Induction of T-Cell
Differentiation in Vitro by Thymin, a Purified
Polypeptide Hormone of the Thymus.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71, 1474-1478 (1974)
3. BASCH, R. S.; GOLDSTEIN, G.: Antigenic and
Functional Evidence for the in vitro inductive
Activity of Thymopoietin (Thymin) on Thymocyte
Precursors.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 249, 290-299 (1975)
4. BLOMBERG, M. von; et al.: Hapten-cell conjugates
in DNCB contact sensitivity. In vitro stimulation
with DNCB-conjugates optimally inducing contact
sensitivity in vivo.
Immunology 39, 291-299 (1980)
5. BOREL, A.; FAULCONNET, M; MIESCHER, P. A.: The
effect of 6-mercaptopurine (6-MP) and methotrexate
(MTX) on passive delayed hypersensitivity reactions.
Int. Arch. Allergy 33, 583-592 (1968)
6. BORK, K: Vulgäres Ekzem, Allergische Kontaktderma-
titis in KORTING, G. W.: Dermatologie in Praxis
und Klinik, Band II, Spezielle Dermatologie 11.16-
11.28; Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1980)

7. BRAUN-FALCO, O.; BURG, G.: Histochemische und cytochemische Untersuchungen bei der allergischen DNCB-Kontaktdermatitis des Meerschweinchens. Arch. Klin. exp. Derm. 239, 307-322 (1970)
8. BRAUN-FALCO, O.; WOLFF, H. H.: Zur Ultrastruktur der menschlichen Epidermis bei der allergischen Epikutantestreaktion. Arch. dermat. Forsch. 240, 23-37 (1971)
9. BRAUN-FALCO, O.; PLEWIG G.; WOLFF, H. H.: Dermatologie und Venerologie 287-303; Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo (1983)
10. BREHM, G.; PULVERMACHER, H.: Untersuchung der Wirkung von Antilymphozyten-Serum auf das experimentelle 2,4-DNCB-Ekzem beim Meerschweinchen. Arch. klin. exp. Derm. 235, 336-345 (1969)
11. BUCHHOLZ, W.: Untersuchungen zum Einfluß des Vitamin A auf das DNCB-Ekzem des Meerschweinchens. Derm. Mschr. 162, 312-316 (1976)
12. BÜRKLE, P. A.; et al.: Experiences with DNCB sensitization in normal human individuals of various age groups. Z. Immunitätsforsch. 151, 153-165 (1976)
13. BURG, G.: BRAUN-FALCO, O.: 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol (DNCB)-Salbe zur Sensibilisierung, Testung und Behandlung von Patienten mit malignem Melanom. Deut. Med. W.schr. 6, 210-211 (1977)

14. CANTOR, H; BOYSE, E. A.: Development and function of subclasses of T cells.
J. reticuloendoth. Soc. 17, 115-118 (1975)
15. CANTOR, H.; BOYSE, E. A.: T cell subclasses and regulation of the immune response.
In: Singhal and Sinclair, suppressor cells in immunity, pp. 34-41 (1975 University of Western Ontario, London)
16. CASH, J. T.: The dermatitis produced by east Indian satinwood ("chloroxylon swietenia").
Brit. med. J. II, 784-790 (1911)
17. CATALONA, W. J.; TAYLOR, P. T.; RABSON, A. S.; CHRETION, P. B.: A method for dinitrochlorobenzene contact sensitization - A clinicopathological study.
New Engl. J. Med. 268, 399-402 (1972)
18. COOMBS, R. R. A.; GELL, P. G. H.: Classification of allergic reactions, responsible for clinical hypersensitivity and disease.
In: Clinical Aspects of Immunology, 575-596,
Hrsg. von P. G. H. Gell, R. R. A. Coombs, P. J. Lachmann, Blackwell, Oxford (1968)
19. DANTUCCIO, F.; SCARDIGNO, A.; SINISI, D.: Histo-morphologie des experimentellen Kontaktekzems durch DNCB beim Meerschweinchen.
G. Minerva dermat. 114, 31-38 (1979)
20. DJAWARI, D. et al.: Cross allergies following sensitization with dinitrochlorbenzol (DNCB).
Hautarzt 31 (4), 198-202 (1980)

21. FIORILLI, M.; SIRIANNI, M. C.; PANDOLFI, F.;
QUINTI, I.; TOSTI, U.; AIUTI, F.; GOLDSTEIN, G.:
Improvement of natural killer activity and T cells
after thymopoietin pentapeptide therapy in a
patient with severe combined immunodeficiency.
Clin. exp. Immunol. 45, 344-351 (1981)
22. FOUSSEREAU, J. et al.: Value of a new technique
of sensitization to dinitro-2,4-chlorobenzene.
Contact Dermatitis 1, 200-206 (1975)
23. FREI, W.: Über willkürliche Sensibilisierung
gegen chemisch definierte Substanzen. I. Unter-
suchungen mit Neosalvarsan am Menschen.
Klin. W. schr. 7, 539-542 (1928)
24. FREI, W.: Über willkürliche Sensibilisierung
gegen chemisch definierte Substanzen. II. Unter-
suchungen mit Neosalvarsan am Tier.
Klin. W. schr. 7, 1026-1031 (1928)
25. FREY, J. R.: Quantitative Untersuchungen bei epi-
dermaler Sensibilisierung von Meerschweinchen mit
Dinitrochlorbenzol.
Dermatologica (Basel) 102, 1-11 (1951)
26. FREY, J. R.; STUDER, A.: Cortison und experimentel-
les Kontaktekzem mit Dinitrochlorbenzol am Meer-
schweinchen.
Dermatologica (Basel) 103, 65-74 (1951)
27. FREY, J. R.; WENK, P.: Experimentelle Untersuchun-
gen zur Pathogenese des Kontaktekzems.
Dermatologica (Basel) 112, 265-305 (1956)

28. FREY, J. R.; GELEICK, H.: Sensibilisierungsweg und Sensibilisierungserfolg beim Kontaktekzem des Meerschweinchens durch Dinitrochlorbenzol.
Dermatologica 124, 389-397 (1962)
29. FREY, J. R.; WECK, A. L. de; GELEICK, H.: Immunological unresponsiveness in allergic dermatitis to dinitrochlorobenzene in guinea pigs.
J. invest. Derm. 42, 41-47 (1964)
30. FRIEDMANN, R. M.; BUCHLER, C. E.; BARON, S.: The effect of aminomethylpteroylglutamic acid on the development of skin hypersensitivity and on antibody formation in guinea pigs.
J. exp. Med. 114, 173 -183 (1961)
31. GOLDSTEIN, G.: The isolation of Thymopoietin (Thymin).
Ann. of the New York Academy of Sciences 249, 177-183 (1975)
32. GOLDSTEIN, G.; SCHEID, M. P.; BOYSE, E. A.; SCHLESINGER, D. H.; WAUWE, J. V.: A Synthetic Pentapeptide with Biological Activity Characteristic of the Thymic Hormone Thymopoietin.
Science 204, 1309-1310 (1979)
33. HALLIDAY, W. J. et al.: The mechanism of tolerance in contact hypersensitivity to DNCB in guinea pigs.
Clin. Exp. Immunol. 16, 203-212 (1974)
34. HUNZIKER, N.: Experimental studies on guinea pig's eczema.
Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1969)

35. HUNZIKER, N.; BRUN, R.: Effect of Methotrexate on Basophilia in Guinea Pig Sensitization.
In: Monographs in Allergy, Vol. 8, 72-78, hrsg. von Parker, D.; Turk, J. L., S. Karger-Verlag, Basel (1974)
36. HURD, E. R.: Immunosuppressive and Antiinflammatory Properties of Cyclophosphamide, Azathioprine and Methotrexate.
Arthritis and Rheumatism, 16, 84-88 (1973)
37. JADASSOHN, J.: Zur Kenntnis der medikamentösen Dermatosen.
In: Jarisch und Neisser, Verhandlungen der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft. 5. Kongreß, Graz 1895, pp 103-129
38. JADASSOHN, J.: Bemerkungen zur Sensibilisierung und Desensibilisierung bei den Ekzemen im Anschluß an einen Fall von Odolekzemen.
Klin. Wschr. 2, 1680-1684 (1923)
39. JADASSOHN, W.: Sensibilisierung der Haut des Meerschweinchens auf Phenylhydrazin.
Klin. Wschr. 9, 551 (1930)
40. JANEWAY, C. A. et al.: The specificity of cellular immune responses in guinea pigs. III. The precision of antigen recognition by T lymphocytes.
J. Exp. Med. 144, 1641-1656 (1976)
41. JOHNS, D. G.; SARTORELLI, A. C.; BERTIUS, J. R.: On the relative toxicities of methotrexate and aminopterin.
Biochem. Pharmacol. 15, 555-561 (1966)

42. KABAT, E. A.: Einführung in die Immunchemie und Immunologie.
Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1971)
43. KARRER, K.: Zur Pharmakologie des DTIC.
Wiener Klin. Wschr. 90, 858-861 (1978)
44. KATZ, S. I.; PARKER, D.; TURK, J. L.: B-cell suppression of delayed hypersensitivity reactions.
In: Nature (Land.) 251, 550-551 (1974)
45. KERL, H.; BURG, G.; BRAUN-FALCO, O.: Quantitative and Qualitative Dynamics of the Epidermal and Cellular Inflammatory Reaction in Primary Toxic and Allergic Dinitrochlorobenzene Contact Dermatitis in Guinea Pigs.
Arch. Dermat. Forsch. 249, 207-226 (1974)
46. KLEIN, R.; KRÜGER G. R. F.; SESTERHENN, K.: T-Lymphozyten im peripheren Blut. Eine Untersuchung an 113 Patienten mit malignem Melanom.
Z. Hautkr. 53, 62-66 (1977)
47. KLEINE, M.-W.: Toleranzerzeugung und Desensibilisierung bei Meerschweinchen durch orale Applikation des Allergens 1-Chlor-2,4-Dinitrobenzol. Dissertation, Medizinische Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München (1977)
48. KOMURO, K.; ROYSE, E. A.: In vitro demonstration of thymic hormone in the mouse by conversion of precursor cells into lymphocytes.
Lancet, 740-743 (1973)

49. LANDSTEINER, K.; JAKOBS, J.: Studies on the sensitization of animals with simple chemical compounds. J. exp. Med. 61, 643 (1935)
50. LANDSTEINER, K.; CHASE, M. W.: Experiments on transfer of cutaneous sensitivity to simple compounds. Proc. soc. Exp. Biol. 49, 688-690 (1942)
51. "LEDERLE" Cynamid: Informationsschrift über MTX Ausgabe Sept. 1977: Folsäureantagonist
52. LEIBIGER, R.: Das Verhalten der azurgranulierten Lymphozyten von Meerschweinchen bei toxischer Dermatitis, bei allergischem DNCB-Kontakt-Ekzem und bei peroraler Desensibilisierung der Tiere mit DNCB. Dissertation, Medizinische Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München (1977)
53. LOECHEL, J.; THORMANN, TH.; LENZ, U.; ZSCHUNKE, E.; SÖNNICHSEN, N.; ECKERT, I.; NEBE, H.; WITKOWSKI, R.: Untersuchungen an tierexperimentellen Modellen zum Nachweis der Sensibilisierungspotenz chemischer Verbindungen. III. Mitteilung: Ergebnisse nach Sensibilisierung mit Dinitrochlorbenzol und abschließende Beurteilung. Derm. Mschr. 160, 445-450 (1974)
54. MACHER, E.; CHASE, M. W.: Studies on the sensitizing of animals with simple chemical compounds. XII. The fate of labelled picryl chloride and DNCB after sensitizing injections. J. exp. Med. 129, 81-102 (1969)

55. MACHER, E.; CHASE, M. W.: Studies on the sensitizing of animals with simple chemical compounds. XII. The influence of excision of allergenic depots on onset of delayed hypersensitivity and tolerance. J. exp. Med., 129, 103-121 (1969)
56. MACHER, E.: Allergisches Kontaktekzem und Immuntoleranz. Der Hautarzt 20, 145-150 (1969)
57. MACHER, E.: Immunologische Mechanismen der Allergie. Z. Haut-Geschl. Kr. 47, 307-318 (1972)
58. MACHER, E.: Immunologie. Hautarzt, 28, Suppl. II, 2-5 (1977)
59. MAGNUSSON, B.; KLIGMAN, A. M.: Allergic contact dermatitis in the guinea pig. Springfield, Ill., Ch. C. Thomas (1970)
60. MAGUIRE, H. C.; MAIBACH, H. J.: Effect of Cyclophosphamide, 6-Mercaptopurine, Actinomycin D and Vincalukoblastine on the Acquisition of delayed Hypersensitivity (DNCB-contact-dermatitis) in the guinea pig. J. invest. Derm. 37, 427-430 (1961)
61. MAGUIRE, H. C.; ETTORE, L.: Enhancement of dinitrochlorobenzene (DNCB) contact sensitization by cyclophosphamide in the guinea pig. J. invest. Derm. 48, 39-43 (1967)

62. MAGUIRE, H. jr.: (Spezifische, erworbene Immun-
toleranz gegenüber Kontaktallergenen bei der Maus
mit Cyclophosphamid) Specific acquired immune
unresponsiveness to contact allergens with
cyclophosphamide in the mouse.
Int. Arch. Allergy 50, 651-658 (1976)
63. MAIBACH, H. I.; MAGUIRE, H. C.: Elicitation of
delayed hypersensitivity (DNCB contact dermatitis)
in markedly panleucopenic guinea pigs.
J. Invest. Dermatol. 41, 123-127 (1963)
64. MAIBACH, H. J.; MAGUIRE, H. C. jr.: Role of species
specificity in failure of inhibition of guinea pig
anaphylactic sensitization with cancer chemo-
therapy drugs.
Nature, 197, 82-83 (1963)
65. MAIBACH, H. I.; MAGUIRE, H. C. jr.: Interchange-
ability of methotrexate and cyclophosphamide as
inhibitor of allergic contact dermatitis in the
guinea pig.
Int. Arch. Allergy 35, 535-543 (1969)
66. MAURER et al.: Predictive evaluation in animals
of the contact allergenic potential of medically
important substances. I. Comparison of different
methods of inducing and measuring cutaneous sen-
sitization.
Contact Dermatitis 4, 321-333 (1978)
67. MAYENBURG, J. von; HEYMER, B.; DÜNGEMANN, H.;
SCHLEIFER, H. K.; SEIDL, H. P.; GALLE, J.; NEISS, A.;
BORELLI, S.: Hautreaktionen gegen isolierte bak-
terielle Zellwandkomponenten, insbesondere bak-
terielle Peptidoglycane.
Z. Hautkr. 55, 710- 733 (1980)

68. MEDAWAR, P. B.: The Croonian lecture. The homograft reaction.
Proc. R. Soc. B 149, 145-166 (1958)
69. MEIER, G. et al.: Detection of age dependent differences of cellular immunity using the DNCB epicutaneous test.
Z. Altersforsch. 29, 285-289 (1975)
70. METZ, J.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen an allergischen und toxischen Epikutantestreaktionen des Menschen.
Arch. Derm. Forsch. 245, 125-146 (1972)
71. MORGADO, F.; FOLCH, H.; MENA Marianela: Immunosuppressive Effects of Tandem Administration of Methotrexate and Folinic Acid.
Folia Biologica 17, 18-25 (1971)
72. NAHAGAWA, S.; FUKUSHIRO, S.; GOTOH, M.; KOHKA, M.; NAMBA, M.; TOWIOKU, K.: Studies on the retest reaction in contact sensitivity to DNCB.
Dermatologica (Basel) 157, 13-20 (1978)
73. NETA, R.; SALVIN, S. B.: Specific suppression of delayed hypersensitivity: The possible presence of a suppressor B cell in the regulation of delayed hypersensitivity.
J. Immunol. 113, 1716-1725 (1974)
74. NEXMAND, P. H.: The cellular content of exudates from eczematous and toxic patch test reactions.
J. invest Dermat. 13, 85-88 (1949)

75. NISHIOKA, K.; AOKI, T.; TASHIRO, M.: Studies on Carrier Substances of DNCB Contact Allergy. *Dermatologica* 142, 232-240 (1971)
76. ORBACH-ARBOUYS, S.; CASTES, M. B.: Augmentation of immune responses after methotrexate administration. *Immunology* 36, 265-269 (1979)
77. PIRQUET, C. von: Allergie. *Münchn. med. Wschr.* 53, 1457 (1906)
78. POLAK, L.: Mechanism of reappearance of contact sensitivity to DNCB in desensitized guinea pigs. *J. invest. Derm.* 66, 38-43 (1976)
79. POLAK, L.: Studies on the role of suppressor cells in specific unresponsiveness to DNCB. *Immunology* 31, 425-432 (1976)
80. POLAK, L. et al.: Effect of the elimination of suppressor cells in the development of DNCB contact sensitivity in guinea pigs. *Immunology* 33, 305-311 (1977)
81. POLAK, L. et al.: Mechanism of desensitization in DNCB contact sensitive guinea pigs. *J. invest. Dermatol.* 70, 98-104 (1978)
82. POLAK, L.; RINCK, CL.: Mechanism of tolerance to DNCB contact sensitivity induced by immunosuppressive agents. *Allergol. et Immunopathol.*, Vol. VI, 39-44 (1978)

83. POLAK, L.: In vitro synthesis in lymphocytes from DNCB contact sensitive guinea pigs.
Exp. cell Biol 48 , 356-366 (1980)
84. POLAK, L.: Immunological Aspects of Contact Sensitivity: an experimental study.
In: Monographs in Allergy, Vol. 15, hrsg. von Dukor, P.; Kallós, P.; Truka, Z.; Waksman, B. H.; De Weck, A. L.; Karger-Verl. Basel, New York (1980)
85. PRZYBILLA, B.; BURG, G.; THIEME, C.: Dinitro-chlorobenzene Contact Allergy Time (DNCB-CAT) - A New Model for Quantitative Evaluation of Cellular Immunity.
Arch. Dermatol. Research, 273, 187-188 (1982)
86. PRZYBILLA, B.; BURG, G.; THIEME, C.: Evaluation of the Immune status in vivo by the 2,4-Dinitro-1-Chlorobenzene Contact Allergy Time (DNCB-CAT).
Dermatologica, Bd. 167, 1-5 (1983)
87. PSCHYREMBEL, W.: Klinisches Wörterbuch mit klin. Syndromen und Nomina Anatomica.
Walter de Gruyter-Verlag, Berlin-New York (1982)
88. REDETZKI, H. M.; REDETZKI, J. E.; ELIAS, A. L.: Resistance of the rabbit to methotrexate: Isolation of a drug metabolite with decreased toxicity.
Biochem. Pharmacol. 15, 425-433 (1966)
89. REHLE, T.: Der Wert des Immunstatus in der Dermatologie.
Dissertation, Medizinische Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität, München (1982)

90. REMY, W.; STÜTTGEN, G.: Die DNCB-Sensibilisierung beim Menschen in analytischer Sicht.
Zeitschrift für Haut- und Geschlechts-Kr. 47,
361-364 (1972)
91. SANTOS, G. W.: Immunosuppressive drugs.
Fed. Proc. Fed. Am. Socs. exp. Biol. 26, 907-913
(1967)
92. SCHEID, M. P.; GOLDSTEIN, G.; Hammerling, U.;
BOYSE, E. A.: Lymphocyte Differentiation from
Precursor Cells in Vitro.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 249, 531-540 (1975)
93. SCHLESINGER, D. H.; GOLDSTEIN, G.: The Amino
Acid Sequence of Thymopoietin II.
Cell. 5, 361-365 (1975)
94. SCHNITZLER, A.: Beitrag zur Frage des Mechanis-
mus der Sensibilisierung.
Dermatologica (Basel), 85, 339-347 (1942)
95. SCHULZE, W.: Zum Mechanismus der epikutanen
Sensibilisierung.
Allergie und Asthma, Bd. 3, Heft 5, 299-305
(1957)
96. SKOOG, M. L.: Measurement and Differentiation
of the cellular infiltrate in Experimental Toxic
Contact Dermatitis.
Acta Dermatovener 60, 239-244 (1980)

97. SOMMER, G.; PARKER, D.; TURK, J. L.: Epicutaneous induction of hyporeactivity in contact sensitization. Demonstration of suppressor cells induced by contact with 2,4-dinitrothiocyanatebenzene. Immunology 29, 517-525 (1975)
98. STEIGLEDER, G. K.: Dermatologie und Venerologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart-New York (1979)
99. STEIGLEDER, G. K.: Taschenatlas der Dermatologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart-New York (1981)
100. STORCK, H.: Das experimentelle Ekzem. Handbuch der Haut- und Geschlechtskrankheiten, Ergänzungswerk II/1, 113-200 (1962)
101. THIES, W.; SCHWARZ, E.; PALME, G.: Zur Pathogenese des Kontaktekzems. I. Autoradiographische Verteilungsstudien beim Meerschweinchen nach epikutaner Applikation von ^3H -Dinitrochlorbenzol. Arch. Klin. exp. Derm. 223, 558-567 (1965)
102. TURK, J. L.; HUMPHREY, J. H.: Immunological unresponsiveness in guinea pigs.
II. The effect of unresponsiveness on the development of delayed type hypersensitivity to protein antigens. Immunology 4, 310-317 (1961)
103. TURK, J. L.: Studies on the mechanism of action of methotrexate and cyclophosphamide on contact sensitivity in the guinea pigs. Int. Arch. Allergy, 24, 191-200 (1964)

104. TURK, J. L.; PARKER, D.; POULTER, L. W.: Functional aspects of the selective depletion of lymphoid tissue by cyclophosphamide.
Immunology 23, 493-501 (1972)
105. TURK, J. L.; PARKER, D.: Further studies on B-lymphocyte suppression in delayed hypersensitivity, indicating a possible mechanism for Jones-Mote hypersensitivity.
Immunology 24, 751-758 (1973)
106. WEBER, E.: Grundriß der biologischen Statistik.
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart 184-190,
599-604 (1980)
107. WEIMANN, D.; BURG, G.; PRZYBILLA, B.; THIEME, C.: Immunoregulatory Effect of a Synthetic Thymopoietin Pentapeptide on the Primary DNCB Contact Allergy Time (DNCB-CAT) in Guinea Pigs.
Arch. Dermat. Research 273, 186-187 (1982)
108. WILLIAMS, A. C.; KLEIN, E.: Experiences with local chemotherapy and immunotherapy in pre-malignant and malignant skin lesions.
Cancer 25, 450-462 (1970)
109. WINKELMANN, HUNZIKER, N.: Cell populations in experimental contact dermatitis.
Arch. Derm. (Chicago) 113, 1543-1549 (1977)
110. ZINSSER, H.: Studies on the tuberculin reaction and on specific hypersensitiveness in bacterial infection.
J. exp. Med. 34, 495-524 (1921)

An dieser Stelle möchte ich mich recht herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. G. Burg für die Überlassung des Themas und die wertvolle Unterstützung bei der Erstellung der Dissertation bedanken.

Ferner gilt mein Dank den Tierpflegern der Dermatologischen Universitätsklinik München (besonders H. Dumhardt) für ihre Hilfe.

Meiner Ehefrau Erna danke ich für die Durchsicht des Manuskriptes und für dessen Reinschrift.

LEBENS LAUF

Am 12. Oktober 1952 wurde ich, Dieter Weimann als Sohn des Postbeamten Alois Weimann und seiner Ehefrau Annelies, geb. Neukirch, in Mörslingen, Kreis Dillingen/Donau geboren.

Nach der Volksschule besuchte ich das mathematisch-naturwissenschaftliche Gymnasium bis zur 9. Klasse. Im Anschluß daran holte ich nach einer Ausbildung zum Großhandelskaufmann auf dem "zweiten Bildungsweg" zuerst die mittlere Reife und danach die Allgemeine Hochschulreife nach.

Im Wintersemester 1977/78 begann ich mit dem Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München.

1979 absolvierte ich an der LMU die ärztliche Vorprüfung. 1980 legte ich den ersten, 1982 den zweiten und 1983 den dritten Abschnitt der ärztlichen Prüfung ab.

Im November 1983 wurde mir die Approbation als Arzt erteilt.

